

In vitro- und in vivo- Charakterisierungen der rekombinanten Coxsackievirusvariante CVB3GM-CSF

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Kathleen Handke**
geboren am 6. Juni 1979 in Altenburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Axel Stelzner
2. PD Dr. Holger Sigusch
3. PD Dr. Karin Klingel

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.01.2005/ Examen 09.11.2005

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
AV-Block	atrioventrikulärer Block
β-Aktin	beta-Aktin
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CK-MB	Kreatinkinase (vorwiegend Herzmuskel)
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
CVB3	Coxsackievirus B3
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonatwasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP`s	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithioreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EKG	Elektrokardiogramm
FCS	fetales Kälberserum
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GMK	green monkey kidney
h	Stunde
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
LD ₅₀	letale Dosis ₅₀
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MEM/E	Minimum Essential Medium
min	Minuten
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NTR	Nichttranslatierende Region
o-dT	oligo-dT
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaktion)
pfu	plaque forming units
p.i.	post infectionem
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT	Reverse Transkription
SCID	severe combined immune deficient
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose ₅₀
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
UE	Untereinheit
VP	Viruskapsidprotein
VPg	virales Protein, genomassoziiert
VV	Vakzinia Virus
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
ZVD	zentraler Venendruck
50x/ 100x/200x/	Vergrößerung 50-, 100-, 200-fach
400x/ 630x	Vergrößerung 400-, 630-fach

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Picornaviren	3
2.2. Coxsackie B-Viren	4
2.3. Myokarditis	5
2.4. Dilatative Kardiomyopathie	8
2.5. Zytokine	11
2.6. Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor (GM-CSF)	12
3. Zielstellung	15
4. Material und Methoden	17
4.1. Materialien	17
4.1.1. Das rekombinante CVB3GM-CSF	17
4.1.2. Oligonukleotid-Primer	17
4.1.3. Enzyme, Zytokine und Antikörper	17
4.1.4. Chemikalien	18
4.1.5. Geräte	20
4.1.6. Puffer und Stammlösungen	20
4.2. Methoden	22
4.2.1. Erstellen einer Virusstammsuspension	22
4.2.2. Virustitration mittels Plaquetest	22
4.2.3. Virustitration mittels TCID ₅₀ -Test	23
4.2.4. Erstellen einer Wachstumskurve	23
4.2.5. GM-CSF-Bioassay	24
4.2.6. RNA-Extraktion	24
4.2.7. Reverse Transcription (RT)	25
4.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Programme und Ansätze	26
4.2.9. Sequenzierung	27
4.2.10. Immunhistochemische Untersuchung	28
5. Ergebnisse	30
5.1. In vitro-Ergebnisse	30
5.1.1. Virusstammlösung	30
5.1.2. Wachstumskurve	30
5.1.3. Sequenzierung	31
5.1.4. Biologische Wirksamkeit	32
5.2. In vivo-Ergebnisse	33
5.2.1. Virustitration	33
5.2.2. RNA-Extraktion	34
5.2.3. Immunhistologische Untersuchung	37
5.2.4. Histologische Untersuchung	40

5.3. Infektionsversuche	45
5.3.1. Direkte protektive Wirkung	45
5.3.2. Indirekte protektive Wirkung	45
5.4. Koinfektionsversuche	48
5.4.1. Koinfektion mit CVB3H3EGFP in vitro	48
5.4.2. Koinfektion mit CVB3H3EGFP in vivo	51
6. Diskussion	57
6.1. In vitro Charakterisierung des rekombinanten, GM-CSF-exprim. CVB3	58
6.2. Nachweis infektiösen Viruses mittels TCID₅₀-Test und auf RNA-Ebene	59
6.3. Nachweis von GM-CSF mittels immunhistochemischer Untersuchung und RT-PCR	60
6.4. Bewertung der histologischen Untersuchung	61
6.5. Koinfektion mit CVB3H3EGFP in vivo und in vitro	62
6.6. Challenge mit letalem CVB3H3	63
7. Schlussfolgerung	66
8. Literatur	68

1. Zusammenfassung

Einleitung: Das humanpathogene Coxsackievirus B3 (CVB3) gehört zu den häufigsten Erregern einer viralen Myokarditis. Nach einer akuten Phase kann die Erkrankung in einen chronischen Prozess übergehen und zur Fibrosierung des Herzmuskels mit Herzinsuffizienz und/oder Dilatativer Kardiomyopathie führen. Sowohl in der akuten wie auch in der chronischen Phase der Erkrankung wird der Verlauf durch Zytokine beeinflusst. Der Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) ist ein Zytokin der TH1-Antwort. Er verstärkt die zelluläre Immunantwort, indem die antimikrobielle Aktivität sowie Wachstum und Differenzierung von Neutrophilen und Makrophagen gesteigert wird. Weiterhin wird die Antigenpräsentation durch die Langerhanszellen der Haut erhöht.

Aufgabenstellung: Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass Viren, die ein biologisch aktives Zytokin exprimieren, protektive Effekte auslösen. Ob dies auch für ein rekombinantes CVB3 zutrifft, das murines GM-CSF während seiner Replikation exprimiert, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Methoden: Es wurde ein Bioassay zum Nachweis der biologischen Aktivität des Zytokins GM-CSF entwickelt. Weiterhin wurde das Verhalten des rekombinanten Virus in vitro und in vivo (an Balb/c-Mäusen) untersucht. Dazu wurden Zellkulturen nur mit CVB3GM-CSF und zusammen mit einem Coxsackievirus, das ein grün fluoreszierendes Protein exprimiert (CVB3H3EGFP), infiziert. Diese Koinfektion wurde auch in vivo nachvollzogen. Weiterhin wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem letalen CVB3H3 infiziert, um direkte und indirekte protektive Effekte des CVB3GM-CSF aufzuzeigen.

Ergebnisse: In vitro und in vivo zeigte sich, dass CVB3GM-CSF einen attenuierten Phänotyp aufweist. So verlief die Wachstumskurve analog zum CVB3 Wildtyp (CVB3WT), jedoch mit niedrigeren Titern. Bei der intraperitonealen Infektion von Mäusen wurden nur geringe Konzentrationen im Vergleich zum CVB3WT erreicht. Das Maximum wurde im Pankreas am 4. Tag p.i. und nicht am 1. Tag p.i. wie bei CVB3WT erreicht. Bei beiden Viren fielen die Konzentrationen im Pankreas wieder ab, so dass am 7. Tag p.i. kein Virus mehr detektierbar war. Jedoch wiesen die CVB3WT-infizierten Tiere eine

deutlich stärkere Entzündung des Pankreas auf. Ein wichtiger Unterschied war der Befall des Herzens durch CVB3WT ab dem 5. Tag p.i., was zu Myozytennekrosen führte. CVB3GM-CSF war zu keinem Zeitpunkt im Herz nachweisbar. Mittels immunhistochemischer Untersuchung konnte bis zum 4. Tag p.i. GM-CSF im Pankreas der CVB3GM-CSF-infizierten Tiere nachgewiesen werden. In einem weiteren Ansatzpunkt sollte die Interferenz zwischen CVB3GM-CSF und anderen Viren untersucht werden. So wurde bei der gleichzeitigen Infektion von Zellkulturen mit CVB3GM-CSF und CVB3H3EGFP bei steigenden Konzentrationen von CVB3GM-CSF eine geringere Anzahl fluoreszierender (also CVB3H3EGFP-infizierter) Zellen detektiert. Dies wurde in vivo nachvollzogen und führte zu entsprechenden Ergebnissen. Die Titer der Tiere, die zusätzlich CVB3GM-CSF erhielten, waren niedriger. Um die direkte protektive Wirkung des CVB3GM-CSF vor einer letalen Infektion nachzuweisen, wurden Tiere einen Tag nach Inokulation von CVB3GM-CSF mit CVB3H3 infiziert und das Überleben im Verlauf von 4 Wochen beurteilt. Es überlebten 66,7 % der Tiere. Eine indirekte protektive Wirkung wurde untersucht, indem die Tiere erst 3 Wochen nach CVB3GM-CSF-Injektion mit CVB3H3 infiziert wurden. Von diesen Mäusen verstarb keine.

Diskussion: Es ist bekannt, dass rekombinante Viren zu einem attenuierten Phänotyp führen. Dies gilt auch für andere Virusstämme wie z. B. Respiratory Syncytial Viren. Dieses Virus, das ebenfalls die Sequenz für GM-CSF enthält, führte auch zu erhöhten Interferon- γ - und Interleukin-12 p40-Spiegeln. Zusammen mit der Wirkung von GM-CSF kann es so zu einer verstärkten zellulären Immunantwort kommen. Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass die Anzahl antigenpräsentierender Zellen und deren Aktivität durch GM-CSF erhöht wird, außerdem führt es zu einer langanhaltenden Aktivierung des Immunsystems. Auf welchem Weg dies geschieht, ist noch unklar. Bei einer direkten Virusinterferenz kann ein attenuiertes Virus protektive Effekte auslösen und zu einer schnelleren Viruselimination beitragen. So führt die simultane Expression von TH1-Zytokinen zu einer geringeren Pathogenität und einer langanhaltenden Aktivierung des Immunsystems.

Schlussfolgerung: Da GM-CSF die Antigenpräsentation verstärkt, könnte es, besonders in Kombination mit anderen Zytokinen, eine Rolle als Immunadjuvanz spielen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Picornaviren

Die Picornaviren bilden eine der sechs Virusfamilien, die einsträngige RNA in Plusstrangorientierung besitzen. Ihr Name beruht auf dem griechischen $\pi\acute{\iota}\kappa\omicron\varsigma$ = klein und der Abkürzung für Ribonukleinsäure (RNA), womit zwei der wesentlichsten Eigenschaften beschrieben werden. Sie können sehr unterschiedliche (leichte, bis zu hin zu schweren) Erkrankungen hervorrufen und werden in die zwei Untergruppen „säurestabil“ und „säurelabil“ eingeteilt. Die säurestabilen Picornaviren, zu denen die Genera Enterovirus, Parechovirus, Hepatovirus und Cardiovirus zählen, gelangen vor allem über die Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes in den Organismus. Die säurelabilen Erreger hingegen infizieren über den Hals-Nasen-Rachen-Raum. Zu diesen zählen die Genera Rhinovirus und Aphthovirus. Voraussichtlich werden noch drei vorgeschlagene Genera zu dieser Virusfamilie hinzukommen (Erbovirus, Kobuvirus, Teschovirus) (Mayo 2002, Oberste et al. 2002).

Picornaviren sind kleine, etwa 30 nm große, ikosaedrische Partikel, deren Nucleocapsid aus 60 identischen Protomeren aufgebaut sind. Die Protomeren bestehen aus den Hüllproteinen VP1, VP2, VP3 und VP4 (Fields et al. 1996), deren Feinstruktur in den einzelnen Genera unterschiedlich ist. Dabei liegen VP1 bis VP3 an der Oberfläche, das VP4 hingegen ist an der Innenseite lokalisiert und wahrscheinlich mit der RNA des Genoms assoziiert. Keines der Proteine ist carboxyliert (Modrow et al. 2003, Braun et al. 2004).

Die Viren haben einen offenen Leserahmen, der für ein einziges Vorläuferprotein kodiert, das aus etwa 2100 Aminosäuren (AS) besteht. Dieses wird von den zwei Proteasen 2A und 3C gespalten. Die 2A-Protease ist eine Cystinprotease, die ihre Aktivität cotranslational entfaltet, die 3C-Protease hingegen schneidet erst relativ spät in der Translation.

Das Genom besteht aus 7,2 bis 8,5 Kilobasen (kb) und ist am 3'-Ende polyadenyliert. Das 5'-Ende hat eine Sekundärstruktur, die IRES, die eine Bindung unabhängig von der 5'-Cap-Struktur ermöglicht. Außerdem ist das 5'-Ende kovalent an VPg (virales Protein, genomassoziiert) gebunden. Am aminoterminalen Ende befinden sich die Sequenzen für die Capsidproteine 1A bis 1D (entspricht den VP4 bis VP1) und in der Mitte die Nichtstrukturproteine

2A, 2B und 2C. Am carboxyterminalen Ende (3A bis 3D) sind die enzymatischen Komponenten, z. B. die RNA-abhängige RNA-Polymerase und weitere Nichtstrukturproteine codiert. Da die RNA in Plusstrangorientierung (also im Sinne von mRNA) vorliegt, kann sie sofort translatiert werden und ist somit per se infektiös.

2.2. Coxsackie B-Viren

Die Coxsackieviren sind 1948 von G. Dalldorf in Stuhlproben entdeckt und aufgrund fehlender Kreuzreaktivität ihrer Antikörper (AK) mit Polioviren als Coxsackieviren bezeichnet worden (Dalldorf und Sickles 1948). Coxsackie ist ein Ort im US-Bundesstaat New York, wo die Viren erstmals nachgewiesen worden sind. Nach tierexperimentellen Gesichtspunkten werden sie in die Subgruppen A (23 Serotypen, 1-24, 23 fehlt) und B (6 Serotypen) eingeteilt.

Sie gehören zur Familie der Picornaviren und dem Genus der Enteroviren. In Epidemiologie und Übertragung ähneln sie den Polioviren, werden also direkt durch Schmutz- oder Schmierinfektion und über Lebensmittel sowie Wasser übertragen, das Virus wird also per os ingestiert. Auch hier ist der Mensch unter normalen Bedingungen das einzige Erregerreservoir. Nach der Aufnahme in den Organismus replizieren sich die Viren zuerst in den Halslymphknoten und in den Peyer'schen Plaques des Darms. Sie werden in der Virämiephase mit dem Blut und durch infizierte Lymphozyten im Körper verteilt (Böcker et al. 2001). Die ersten infiltrierenden Zellen sind Granulozyten. Darauf folgen mononukleäre Zellen. Die Inkubationszeit beträgt 10 bis 14 Tage. Häufig verläuft die Infektion asymptomatisch, sie kann jedoch auch von leichten Erkältungssymptomen bis zu Meningitis, Myokarditis oder Lähmungen des ZNS reichen. Männer erkranken häufiger als Frauen.

Eine CVB4-Infektion in Kombination mit bestimmten HLA-Typen wird oft bei Typ-I-Diabetikern gefunden. Es wird ein kausaler Zusammenhang diskutiert (See und Tilles 1995).

Die CVB3 gelten zur Zeit als die häufigsten Erreger einer akuten Perimyokarditis und der chronischen Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) (Schultheiß et al. 1998, O'Connell et al. 1995). Bei Säuglingen, die diese Infektion perinatal erwerben und deren Mutter keine Antikörper hat, verläuft die Myokarditis oft sehr schwer, sogar tödlich (Kandolf 1998). So wird der Verlauf

der Infektion unter anderem auch von der Immunkompetenz des Wirtes beeinflusst (Leipner et al. 1999, Leipner et al. 2000, Merkle et al. 1999).

Momentan gibt es noch keine spezifische Therapie bei Coxsackievirusinfektionen, eine Schutzimpfung ist ebenfalls nicht verfügbar.

Typische Erkrankungen, die durch Coxsackieviren hervorgerufen werden, sind in Tabelle 1 aufgeführt (Modrow et al. 2003, Braun et al. 2004).

Tab. 1: Typische, von verschiedenen Subgruppen der Coxsackieviren hervorgerufene Erkrankungen

Coxsackievirustyp	Hervorgerufene Erkrankung(en)
A2-6, A8, A10, A22	Herpangina
A4-6, A9, A16	Hand-Fuß-Mund-Krankheit
A4-6, A9, A16	Schleimhautläsionen
A1-2, A4-7, A9-10, A14, A16, A22, B1-6	Aseptische Meningitis
A10	Pharyngitis
A24	Akute hämorrhagische Konjunktivitis
A4, A9, B5	Hepatitis
A4, A7, A9, A10, B1-5	Lähmungen (sehr selten A-Typen)
A18, A20-22, A24, B5	Durchfallerkrankungen bei Kindern
B1-6	Fieber und grippeähnliche Symptome
B1-5	Pleurodynie, Perikarditis, Myokarditis, Systemische Infektionen bei Kindern, Meningoenzephalitis, Hautausschläge
B4	Diabetes mellitus

2.3. Myokarditis

Eine Myokarditis ist eine entzündliche Herzmuskelerkrankung, die die Kardiomyozyten, das Interstitium und die Gefäße betreffen kann. Ein Befall des Perikards ist ebenfalls möglich. Sie kann herdförmig oder diffus, sowie akut oder chronisch-rezidivierend auftreten (Schultheiß et al. 1998), kennzeichnend sind Entzündungsinfiltrate und/oder Nekrosen. Bei kardiotropen Viren kommt es in etwa 1 % der Fälle zu einer Mitbeteiligung des Herzens, bei Coxsackieviren sogar in zirka 4 % der Fälle. Da die Infektion meist mild oder asymptomatisch

verläuft, gibt es eine hohe Dunkelziffer. So finden sich im Autopsiegut von gerichtsmedizinischen Fällen 1 % Myokarditisfälle (Gravanis und Sternby 1991), in anderen Publikationen wird von 2-3 % ausgegangen (Schultheiß et al. 1998). Man schätzt, dass etwa 70 % der Bevölkerung Kontakt mit kardiotropen Viren hat. Etwa 50 % der Myokarditiden werden durch Viren verursacht. Dies sind insbesondere die Enteroviren mit den CVB1-5 und die Herpesviren. CVB haben die höchste Inzidenz bei den kardiovaskulären Erkrankungen. Sie verursachen 34,6 Fälle von 1000 (Friman et al. 1995). Es lassen sich bei 25 % der Patienten mit akuter Myokarditis oder Dilatativer Kardiomyopathie enterovirale RNA nachweisen (Schultheiß et al. 1998), wobei vorbestehende Herzmuskelerkrankungen keinen Risikofaktor für Virusmyokarditiden darstellen (Kandolf et al. 1993). Bakterielle Myokarditiden treten insbesondere bei septischen Erkrankungen auf, wie z. B. bei Streptokokken- oder Enterokokkeninfektionen, bei Borrelien nach einer Lyme-Erkrankung oder bei Diphtherie. Selten kommt es zu einer Myokarditis bei Tbc, Typhus, Lues und anderen Krankheiten. Infrage kommen noch Pilze (besonders bei Abwehrschwäche), Protozoen und Parasiten, sowie eine Mitbeteiligung des Herzens bei rheumatoider Arthritis, nach Bestrahlung des Mediastinums oder durch kardiotoxische Medikamente. Bei den Virusmyokarditiden wird eine Kreuzreaktivität mit myokardialen Strukturen diskutiert (Caforio et al. 2002). So kommen in der akuten Erkrankungsphase bei 70-80 % antimyolemmale oder antisarkolemmale AK vor. Zur Verlaufskontrolle kommt der histologischen Bearbeitung von Biopsien eine besondere Bedeutung zu. Die momentane Einteilung der Histologie wird in Tabelle 2 ersichtlich.

Zur Diagnosesicherung ist ein Linksherzkatheter mit Gewinnung von Biopsien möglich. In der Frühphase der akuten Virusreplikation finden sich hohe Kopienzahlen des Virusgenoms im infizierten Gewebe. Es erfolgt eine hämatogene Infektion kardialer Myozyten, an die sich eine Zell-zu-Zell-Ausbreitung anschließt. Dies führt zu reaktiven Entzündungsinfiltraten mit fokalen Entzündungsherden. Erst dann findet die Eindämmung durch die zelluläre und humorale Immunität statt. Ein Übergang in eine chronische Infektion ist meist mit einer Hypertrophie und Degeneration von Myozyten sowie einer interstitiellen Fibrose im Sinne einer DCM charakterisiert (Kandolf 1998). Für den Übergang einer Myokarditis in eine Kardiomyopathie gibt es drei

Theorien: Die Persistenz von viraler RNA, eine T-Zell-vermittelte Immunantwort und der apoptotische Zelltod (Kawai 1999, Kandolf et al. 1993, Klingel et al. 1996).

Tab. 2: Einteilung der Myokarditiden nach histologischer bzw. immunhistologischer Auswertung der Biopsien

Diagnose	Konventionelle Histologie (Dallas-Kriterien 1987)	Histologische und Immunhistologische Kriterien (ISFC-Klass. 1998)
1. aktive/akute Myokarditis	Infiltrat, Myozytolyse, Ödem	Infiltrat, charakt. mit monoklonalen AK, Immunglobulin- und Komplementfixation. Inobligat: De novo-Expression von HLA-AG der Klasse-I und -II und Adhäsionsmolekülen
2. fortbestehende Myokarditis	Wie 1., aber in der Folgebiopsie bei Verlaufsbeobachtung	Wie 1.
3. abheilende Myokarditis	Rückläufiges Infiltrat, fakultative Myozytolyse, reparative Fibrose	Wie 1.
4. Borderline Myokarditis	Eingestreute, selten Lymphozyten ohne Myozytolyse	Grenzbefund zur Myokarditis bei 1-13 Lymphozyten/mm ³
5. chronische Myokarditis, Dilatative Kardiomyopathie mit Entzündung	Nicht definiert	14 Lymphozyten (+ Makrophagen)/mm ³ , fakultativer immunologischer Nachweis von viraler RNA oder DNA

Die Klinik der virusinduzierten Myokarditis kann ein sehr unterschiedliches Bild bieten. So sind die Mehrzahl der Fälle asymptomatische oder milde Verläufe, jedoch ist auch ein tödlicher Ausgang möglich, der besonders bei Säuglingen auftritt (Letalität bis zu 50 %) (Kandolf 1998).

Zirka 66 % der Erkrankten sind Männer, Frauen sind meist im letzten Trimenon betroffen. Die Beschwerden stehen oft mit dem Infekt in Zusammenhang. So klagen die Patienten über Müdigkeit, Schwächegefühl oder einen Leistungsabfall. Ausserdem kann es zu ventrikulären Tachykardien und Rhythmusstörungen (Extrasystolen), kommen, die der Patient als Herzstolpern bemerkt, auch AV-Blöcke können auftreten. Im fortgeschrittenen Stadium finden sich Zeichen einer Herzinsuffizienz. Dabei ist die Auskultation oft uncharakteristisch, manchmal sind flüchtige systolische Geräusche zu hören. Im Labor können die CK-MB, Troponin T und I erhöht sein. Gelegentlich sind die Entzündungsparameter gesteigert oder es lassen sich Antikörper (AK) gegen Streptokokken oder Enteroviren nachweisen. Veränderungen des EKG's sind relativ häufig und passager, wie Sinustachykardien oder Extrasystolen. Auf dem Röntgenbild können erst im Spätstadium, wenn Anzeichen einer DCM gefunden werden, Veränderungen gesehen werden.

Eine kausale Therapie ist bei bakteriellen Ursachen, wie z. B. eine Penicillingabe bei Streptokokken indiziert, bei viralen Myokarditiden wird in kontrollierten Studien mit Zytokinen wie Interferon (IFN)- α gearbeitet (Lawson und Beilharz 1999, Heim et al. 1997). Eine symptomatische Behandlung ist möglich.

2.4. Dilatative Kardiomyopathie

1995 wurden von der WHO und der ISFC-Task-Force eine Klassifikation eingeführt, die sich im wesentlichen an pathophysiologischen, ätiologischen und pathogenetischen Prinzipien orientiert. Dabei wird zwischen den in Tabelle 3 aufgeführten Formen unterschieden (Maisch 1998).

Die Dilatative Kardiomyopathie ist hämodynamisch definiert als systolischer Pumpfehler mit Kardiomegalie und eingeschränkter Ejektionsfraktion, zusätzlich bestehen Störungen der Compliance. Das pathologische Korrelat ist die interstitielle Fibrose und eine strukturelle Alteration der extrazellulären Matrix, in deren Gefolge Störungen der Relaxation auftreten. Falls die Ursache der Erkrankung unbekannt ist, wird sie idiopathische Kardiomyopathie genannt, falls sie bekannt ist, spezifische Kardiomyopathie. Die Inzidenz beträgt 6:100000, die Prävalenz 36:100000 (Sugrue et al. 1992, Gillum 1986, Manoli et al. 1992). Jährlich treten in den USA etwa 100000 neue DCM-Fälle auf. Männer sind im

Verhältnis 3:1 häufiger betroffen (Codd et al. 1991). Bei 15-20 % der Fälle gibt es eine familiäre Häufung, wobei unterschiedliche Gendefekte bekannt sind, wie z. B. die x-chromosomal-rezessive Mutation des Dystrophingens (Franz et al. 1995).

Tab. 3: Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO/ISFC-Task-Force

Bezeichnung	Abkürzung	Charakteristikum
1. Dilatative Kardiomyopathie	DCM	Systolischer Pumpfehler
2. hypertrophische Kardiomyopathie mit und ohne Obstruktion	HCM	Diastolischer Compliancefehler (= Störung der Dehnbarkeit des Herzmuskels in der Diastole = vermehrte Steifigkeit)
3. restriktive Kardiomyopathie	RCM	Endomyokardfibrose mit und ohne Eosinophilie, Diastolischer Pumpfehler
4. arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	ARVCM	Überwiegend rechtsventrikulärer kombinierter Pumpfehler mit ventrikulären Tachykardien
5. nichtklassifizierbare Kardiomyopathie	NKCM	

Klinisch imponieren körperliche Schwäche im Sinne eines Vorwärtsversagens, eine belastungsabhängige Dyspnoe und eine progressive Linksherzinsuffizienz. Dabei sind z. B. Ödeme oder beim Rückstau in den kleinen Kreislauf auch ein Lungenödem möglich. 25-59 % der Patienten klagen über Angina-pectoris-ähnliche Schmerzen (Kirchner et al. 1993), ferner sind Rhythmusstörungen besonders ventrikulärer Art zu beobachten. Klinisch kommt es zu einer Erhöhung des zentralvenösen Drucks (ZVD), zu Pleuraergüssen, Lungenstauung, Hepatomegalie, Aszites oder Ödemen. So ist in der Echokardiographie eine Dilatation beider Ventrikel und bei relativer Mitralinsuffizienz auch eine Dilatation des linken Vorhofs zu erkennen sowie

eine verminderte Bewegungsamplitude (= Hypokinesie) der Ventrikelwand bei Einschränkung der systolischen Einwärtsbewegung. Als Index für die Kontraktilität ist die prozentuale systolische Verkürzungsfraction auf unter 30 % vermindert, diese korreliert in etwa mit der angiographischen Ejektionsfraction. Oft kann man Thromben im Ventrikel und/oder im Vorhof besonders gut in der transösophagealen Echokardiographie erkennen. Die Diagnose wird anhand der Klinik, der Echokardiographie und einer Myokardbiopsie gestellt (Figulla et al. 1992, Hare et al. 1992). Mit der Biopsie wird eine Immunhistologie, evtl. eine Virusdiagnostik und ein Auto-AK-Nachweis durchgeführt. Enteroviren verursachen bis zu 50 % der akuten Myokarditiden und etwa 25 % der DCM's. Dabei haben nur etwa 10 % der Patienten mit akuter Myokarditis klinische Symptome, von denen 10-20 % eine chronische Myokarditis entwickeln, die in eine DCM übergehen kann (Sole et al. 1993). CVB-RNA konnte sowohl in der späten Phase der Infektion als auch in der Endphase einer DCM nachgewiesen werden. Das Verhältnis von + zu – Strang ist dabei zugunsten des + Strangs auf ein Verhältnis von 2:1 verschoben (Klingel et al. 1992, Modrow et al. 2003). Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass bei positivem Enterovirusnachweis die Letalität geringer ist, jedoch wird in einer anderen Studie eine höhere Letalität für eine DCM mit positivem Enterovirusnachweis festgestellt (25 % : 4 %) (Figulla et al. 1995, Why et al. 1994).

Die hohe Letalität der DCM ist durch die progrediente Herzinsuffizienz und den plötzlichen Herztod gekennzeichnet. In der Framinghamstudie sind 5 Jahre nach Auftreten von Symptomen 42 % der Frauen und 62 % der Männer gestorben (McKnee et al. 1971). Neben der koronaren Herzkrankheit ist die DCM die häufigste Erkrankung, die einer Herztransplantation nötig macht (Kuhn et al. 1993, Camerini et al. 1993, Manoli et al. 1992). So wird angegeben, dass in 43,5 % der Fälle von Herztransplantationen bei Erwachsenen eine Kardiomyopathie diesen Eingriff nötig machte (O'Connell et al. 1995).

Die Therapie kann bei bekannter Ursache zum Teil kausal erfolgen. So ist eine dauerhafte Alkoholkarenz oder das Absetzen kardiotoxischer Medikamente nötig. Außerdem wird die Herzinsuffizienz symptomatisch mit körperlicher Schonung, β -Blockern, ACE-Hemmern, Diuretika und eventuell Digitalisglykosiden behandelt. Bei einer Ejektionsfraction unter 40 % ist auch eine Thromboembolieprophylaxe angezeigt sowie eine Therapie der

Rhythmusstörungen. Bei positivem Enterovirusgenomnachweis wird zur Zeit besonders IFN- α eingesetzt (Heim et al. 1994, Stille Siegener et al. 1995). Der Einsatz von IFN- β erscheint ebenfalls vielversprechend (Kuhl et al. 2003). Die Gabe von Wachstumshormonen, die den TNF- α -Spiegel senken und die Apoptose hemmen, blieb ohne den gewünschten prognostischen Erfolg (Fazio et al. 1996, Osterziel et al. 1997). Bei terminaler Herzinsuffizienz bleibt bloß noch die Implantation eines Unterstützungssystems des linken Ventrikels (Frazier et al. 1995) oder die Herztransplantation als ultima ratio.

2.5. Zytokine

Zytokine werden auch als die Hormone des Immunsystems bezeichnet. Um sie von den Peptidhormonen abgrenzen zu können, wurde festgelegt, dass sie Proteine sein müssen, die von Zellen des Immunsystems gebildet werden oder auf diese Zellen wirken (Kirchner et al. 1993). Ebenfalls müssen sie über 5 kDa groß sein, von verschiedenen Zellen produziert werden und mehrere Zielzellen haben. Teilweise überlappende Wirkungen sind nicht selten (Kirchner et al. 1993). Sie sind lösliche Faktoren, die die Kommunikation zwischen den Immunzellen steuern oder die Induktion von Immunreaktionen unterstützen. Sie können die Proliferation und Differenzierung von Leukozyten steuern und Entzündungsreaktionen verstärken oder beenden. Häufig überschneiden sich die Funktionen. Obwohl sie von vielen verschiedenen Zellen gebildet werden können, erfolgt die Hauptproduktion von den Immunzellen selbst. Typisch ist auch ihre große biologische Aktivität und Wirksamkeit, die sie mit sehr geringen Konzentrationen erreichen. Die Wirkung wird über Rezeptoren an der Zytoplasmamembran der Zielzellen vermittelt. Zytokine sind bedeutend für die Aufrechterhaltung der Integrität des Organismus sowie für eine sinnvolle Immunantwort gegen Fremdartigene. So regulieren und koordinieren sie das Zusammenwirken der immunologischen Effektorsysteme, also der zellulären und humoralen Immunantwort.

Der Begriff Zytokine ist 1974 eingeführt worden, jedoch ist schon im 19. Jahrhundert beobachtet worden, dass sich nach Infekten Tumore zurückbildeten. 1957 beschreiben Isaacs und Lindemann einen antiviralen Faktor, den sie Interferon nannten. Cusack und Mitarbeiter entdecken 1975, dass in Mäusen nach Behandlung mit Bacille-Calmette-Guérin (BCG) und

Lipopolysacchariden ein zytotoxischer Faktor induziert wird, der zu hämorrhagischen Nekrosen in Tumoren führt. Deshalb wird dieses Protein als Tumornekrosefaktor (TNF) bezeichnet (Kirchner et al. 1993).

Zu den Zytokinen werden die Interleukine (IL), Interferone, die Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF`s), die Tumornekrosefaktoren und die transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF = transforming growth factor) gezählt. Sie umfassen also eine große Gruppe von Substanzen. Seit einiger Zeit gewinnen sie eine zunehmende Bedeutung in der Therapie von Tumorerkrankungen, Knochenmarktransplantationen, Chemotherapien und AIDS.

So wirken z. B. die CSF`s und IL-3 als hämatopoetische Wachstumsfaktoren und stimulieren die Blutbildung im Knochenmark. TGF- β und IL-10 können die Produktion zusätzlicher Zytokine unterdrücken. IL-1, IL-2, IL-4, IFN- γ und TNF- α sind Beispiele von Zytokinen, die für die Förderung der Freisetzung weiterer Zytokine bedeutend sind. Außerdem steigern sie die Effektorfunktionen monozytärer Phagozyten, natürlicher Killer (NK)-Zellen und zytotoxischer T-Zellen. IFN- α und IFN- β wirken antiviral und IFN- γ immunregulatorisch. Zytokine umfassen sehr unterschiedliche Funktionen und Wirkungsspektren. Der Einfluss der Zytokine auf Infektionen mit dem Coxsackievirus und deren Verlauf wird anhand von Mausmodelle untersucht (Glück et al. 2001, Schmidtke et al. 2000).

2.6. Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor (GM-CSF)

GM-CSF ist ein monomeres Protein von 127 Aminosäuren (Metcalf 1986, Cantrell et al. 1985). Es kann zweifach glykosiliert vorkommen, wodurch die unterschiedlichen Molekulargewichte von 14 und 35 kDa zustande kommen. In vitro haben die beiden Varianten gleiche biologische Aktivität, jedoch ist in vivo das vollständig glykosilierte Protein biologisch aktiver. Kodiert wird es im Menschen auf dem Chromosom 5q22-31 mit 25 kbp, in denen 4 Exons enthalten sind (Huebner et al. 1985, van Leuwen et al. 1989, Yang 1988, Wong 1985). Die Sequenz für IL-3 liegt sehr nah an der Sequenz für GM-CSF, nur 10 kbp von dessen 5'-Ende entfernt (Huebner et al. 1985). Die Deletion von IL-3 und GM-CSF werden beim 5q-Syndrom beobachtet (LeBeau et al. 1986, Huebner et al. 1985).

GM-CSF wird aus einem 144 AS langen Vorläuferprotein gespalten, welches eine 17 AS lange hydrophobe Sekretionssequenz am aminoterminalen Ende enthält. Es beinhaltet 4 Cysteinreste, die für die Tertiärstruktur bedeutend sind. Mit Heparansulfat-Proteoglykanen kann es einen Komplex bilden und so gespeichert werden. Wie die Freisetzung erfolgt, ist unbekannt. Ferner kann es als integrales Membranprotein exprimiert werden und als membrangebundenes oder matrixassoziiertes Protein mit Rezeptoren angrenzender Zellen interagieren. So sind Zell-Zell-Kontakte im Sinne einer juxtakrinen Signalübertragung möglich. Nach den Sequenzanalysen ist GM-CSF nicht mit den anderen Wachstumsfaktoren verwandt. Humanes und murines GM-CSF zeigen eine 60 %-ige Homologie in der Proteinsequenz und eine 70 %-ige in der Nukleotidsequenz (Miyatake et al. 1985, Wong et al. 1985), es existiert jedoch keine Kreuzreaktivität zwischen ihnen.

Der Rezeptor für GM-CSF, der zur Zytokinrezeptorfamilie gehört, hat am N-terminalen Ende eine 200 AS lange extrazelluläre Domäne mit einem Cysteinmotiv, er setzt sich aus einer α -Untereinheit (UE) und einer β -UE zusammen. Die α -UE hat ein Molekulargewicht von 45 kDa und eine geringe Bindungsaffinität. Sie besteht aus 406 AS mit einer kurzen 54 AS langen zytoplasmatischen Domäne, die keine Protein-Tyrosinkinase-Aktivität besitzt. Die β -UE hat ein Molekulargewicht von 120 kDa und gleicht dem IL-2-Rezeptor, sie bindet allein kein GM-CSF (Park et al. 1992, Hayashida et al. 1990, Chiba et al. 1990). Ein hochaffiner Rezeptor wird durch die Aggregation von zwei UE gebildet. Die Dichte des Rezeptors kann von 100 bis 1000 auf myeloiden Zellen variieren. Lymphoide und erythroide Zellen scheinen den Rezeptor nicht zu exprimieren.

Produziert wird GM-CSF von T-Helfer-Zellen, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten (Burgess und Metcalf 1980). Es stimuliert das Wachstum von Monoblasten- und Myeloblastenkolonien. Außerdem fördert es die irreversible Differenzierung von Myelo- und Monoblasten und ist ein starkes Chemokin für neutrophile Granulozyten (Nicola et al. 1983), ebenfalls wirkt es chemotaktisch auf Eosinophile (Warringa et al. 1991). Die antimikrobielle Aktivität, der oxidative Metabolismus und die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen und Makrophagen wird verstärkt (Grabstein et al. 1986), das bedeutet, dass deren Zytotoxizität erhöht wird. Obwohl der Stoffwechsel hochreguliert wird, wird die Lebensdauer

von Granulozyten durch die GM-CSF-Wirkung erhöht. Ebenfalls bewirkt es die Abgabe von Arachidonsäuremetaboliten durch diese Zellen und die Produktion von Superoxid und Peroxid, also reaktiven Sauerstoffmolekülen, wird gesteigert. Der Na^+/H^+ -Gegentransport wird aktiviert, so dass das Zytosol schnell basisch wird. Auf Basophilen wird die Expression des C3a-Rezeptors induziert und in Granulozyten und Makrophagen die Synthese und Abgabe von IL-1, IL-6, TNF- α , G-CSF und M-CSF bewirkt. Der funktionelle Status von Langerhanszellen in der Haut wird sensibilisiert, so dass es zu einer effektiveren Antigenpräsentation kommt. Zusammen mit Erythropoetin wirkt es synergistisch auf die Proliferation erythroider und megakaryoider Vorläuferzellen. Damit umfasst GM-CSF ein sehr weites Wirkungsspektrum, mit Effekten auf sehr viele Zellen (Metcalf 1985).

GM-CSF kann in der Klinik genutzt, um die physiologische Regeneration der Hämatopoese bei verschiedenen Krankheitsbildern, wie z. B. nach Chemotherapien zu fördern (Liang 2003, Burney et al. 2003). Da es den Pool peripher zirkulierender Stammzellen erhöht, kann es auch bei der Gewinnung von Stammzellen aus dem Blut genutzt werden (Siena et al. 1999, Nowrousian et al. 2003).

3. Zielstellung

Im Jahr 2000 haben Chapman et al. erstmals die Expression eines biologisch aktives Proteins mittels eines rekombinanten CVB3 demonstriert. Inzwischen sind am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Klinikums der FSU Jena weitere rekombinante Coxsackieviren etabliert worden.

Die rekombinanten Viren werden nur im Pankreas nachgewiesen, wo sie eine lokale Reaktion verursachen. Das Herz wird zu keinem Zeitpunkt angegriffen. CVB3WT dagegen repliziert sich im Herz und Pankreas von infizierten Mäusen, was zu einer massiven Destruktion des exokrinen Pankreas und einer Entzündung des Herzens führt. Vier Wochen nach der Infektion mit den rekombinanten Viren kann ein Schutz vor einer letalen Infektion mit dem CVB3H3 beobachtet werden, so dass keines der Tiere verstirbt und sie keine Symptome zeigen im Gegensatz zu den Tieren, die vorher mit CVB3WT infiziert worden sind.

GM-CSF ist ein koloniestimulierender Faktor, der das Wachstum und die Differenzierung von Mono- und Myeloblasten verstärkt. Es wirkt als Chemokin für Neutrophile und Eosinophile, außerdem steigert es die antimikrobielle Aktivität und den oxidativen Metabolismus von Neutrophilen und Makrophagen und sensibilisiert den funktionellen Status von Langerhanszellen der Haut. Durch den Einsatz verschiedener Zytokine in den rekombinanten Coxsackieviren können unterschiedliche Ansatzpunkte der Immunantwort beeinflusst werden. So führt GM-CSF zu einer Stimulation der allgemeinen zellulären Abwehr des Immunsystems.

Es sollte die Annahme untersucht werden, ob GM-CSF einen protektiven Effekt hat, wenn es während der Virusreplikation exprimiert wird. Mittels einer vorhandenen Virusstammlösung wurden die Versuche durchgeführt. So sollte nachgewiesen werden, dass das exprimierte GM-CSF biologisch aktiv ist. Außerdem sollte der Verlauf der Infektion in Mäusen beobachtet werden, um festzustellen, wie sich CVB3GM-CSF im Vergleich zu den anderen rekombinanten Viren und CVB3WT verhält. Ein Mausversuch sollte einen möglichen protektiven Effekt auf die Infektion mit dem letalen CVB3H3 belegen. Um eine Interferenz mit anderen Viren beurteilen zu können, wurden in vivo und

in vitro Koinfektionen mit CVB3H3EGFP durchgeführt, um Aufschluss darüber zu gewinnen, ob auch hier protektive Effekte eintreten können.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Das rekombinante CVB3GM-CSF

Mittels PCR wurde unter der Verwendung von GM-CSF-spezifischen Primern die Sequenz von GM-CSF hergestellt. Dieses Produkt wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *SacI* verdaut. Da der endgültige pCVB3M2-Vektor insgesamt vier *SacI*-Schnittstellen hat, wurde die GM-CSF-Sequenz zuerst in einen Hilfsvektor kloniert (pMa5-8Fi Δ *HindIII*). Das darin befindliche *MluI*-*BglII*-Fragment (2048 bp) konnte danach in den Zielvektor pCVB3M2 zwischen das 3' Ende der 5'NTR und dem 5'Anfang von VP4 umkloniert werden. Es erfolgte eine Überprüfung der Insertion mittels Sequenzierung, anschließend wurden GMK-Zellkulturen mit dem Plasmid transfiziert und das erhaltene Virus auf seine Stabilität überprüft.

4.1.2. Oligonukleotid-Primer

β -Aktin	5'-ATGGATGACGATATCGCT-3'
	5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3'
VP1	5'-GGCCCAGTGGAAGACGCG-3'
	5'-AAATGCGCCCGTATTTGTCATTG-3'
RZ10	5'-GCAGCGGAACCGACTACTTTGGG-3'
VP4Seq	5'-TTAATCATGATATCTTTCCTGTTCT-3'

4.1.3. Enzyme, Zytokine und Antikörper

Produkt	Herstellerfirma
Superscript 200 U/ μ l	LIFE TECHNOLOGIES
Taq-DNA-Polymerase 5 U/ μ l	PROMEGA
rec. mouse GM-CSF 2 μ g	BIOSOURCE
Ziege-anti-mouse-GM-CSF 200 μ g IgG/1 ml	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

4.1.4. Chemikalien

Die im Folgenden aufgeführten Chemikalien wurden zur Erstellung dieser Arbeit benötigt.

Produkt	Herstellerfirma
Agar	SERRA
Agarose	LIFE TECHNOLOGIES
Avidin/Biotin Blocking Kit	VEKTOR
Borsäure	SERVA
Bromphenolblau	MERCK
β-Mercaptoethanol	FERAK
Chloroform	SIGMA
Cryomatrix	SHANDON
DAKO-Pen	DAKO
Diethylpyrocarbonat	FLUKA
DMEM	SIGMA
DNA Sequencing Kit	ABI PRISM
dNTP`s	PROMEGA
EDTA	SERVA
Ethanol	J.T. BAKER
Ethidiumbromid	SERVA
FCS	PAA
Formalin	SIGMA
Glycerol	FERAK
Glycerolgelatine	SERVA
Guanidinisothioguanat	SIGMA
Hämatoxilin	FLUKA
HCl	ROTH
Immuno Cruz Staining System	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Isoamylalkohol	SIGMA
Isopropanol	ROTH
KCl	LABORCHEMIE
KH ₂ PO ₄	MERCK
Kristallviolett	ALDRICH

MEM/E 2x	SIGMA
MTT	SIGMA
Naacetat-3-hydrat	GERMED
Nacitratdihydrat	MERK
NaCl	SERVA
NaH ₂ PO ₄	RIEDEL
Na ₂ HPO ₄	RIEDEL
Na-N-Laurylsarcosine	SIGMA
NP 40	SIGMA
Paraformaldehyd	LABORCHEMIE
Phenol	SIGMA
RNeasy Mini Kit	QUIAGEN
Saponin	SIGMA
Smart Ladder	EUROGENTEC
Sucrose	FLUKA
TRIS	SERVA
Trypsin/Versen	GERMED
TSR-Puffer	PERKIN ELMER
Ziegenserum	BIOSOURCE

Außerdem wurden die folgenden Verbrauchsmaterialien benötigt:

Produkt	Herstellerfirma
Deckgläser 24x50 mm	MENZEL-GLÄSER
Histoslides	SHANDON
Omnifix 1 ml	B. BRAUN
STERIKAN Kanülen 0,40 x 20 mm	B. BRAUN
Zellkulturflaschen	BECTON DICKINSON
96-Well-Platten	BECTON DICKINSON

4.1.5. Geräte

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Geräte verwendet:

Gerät	Herstellerfirma
Brutschrank	HERAEUS INSTRUMENTS
Zentrifuge 54 17 A	EPPENDORF
E.A.S.Y. RH-3	HEROLAB
Extinktionsmeßgerät DYNATECH MR 5000	DIAS
Hot plate stirer 502 series	SIGMA
Kryotom	SHANDON
Mikroskop Axioscop 2 MOT	ZEISS
Schüttler MTS 4	IKA
Ultraturrax	JANKE + KUNKEL
UV-160 A	SHIMADZU
Vakuumtrockner Concentrator 5301	EPPENDORF
Vortexer Mix Max II	THERMOLYNE
PCR-Cycler PTC-200	BIOZYM

4.1.6. Puffer und Stammlösungen

Lösungen für Gelelektrophorese:

5x TBE-Puffer:	54,0 g TRIS; 27,5 g Borsäure; 4,65 g EDTA; mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen; auf pH 8,0 bis 8,1 einstellen
DNA/RNA-Ladepuffer:	30 % Glycerol; 0,25 % Bromphenolblau; 10 mM EDTA; pH 8,0
Ethidiumbromid-Stammlösung:	5 mg/ml
1,2 %-iges Agarosegel:	1,44 g Agarose; 120 ml 0,5fach TBE-Puffer; 12 µl Ethidiumbromid

Lösungen für RNA-Extraktion:

- Lösung I: 4,0 M (50 g) Guanidinisothioguanatin in 50 ml Aqua bidest. lösen, 0,017 M (0,5 g) Na-N-Laurylsarcosine; 0,025 M (0,74 g) Na-Citrat-Dihydrat; mit 1N NaOH pH auf 6,4 einstellen; mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen; steril filtrieren (Porengröße 22 µm); vor Versuchsbeginn mit 7 bis 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml versetzen
- Lösung II: 10 ml Phenol; 1,0 ml 3 M Na-Acetat, 2 ml Chloroform-Isoamylalkohol
- Lösung III: Isopropanol
- DEPC-H₂O: 1 ml Diethylpyrocarbonat; 1000 ml Aqua bidest.; 24 h rühren; 3x autoklavieren
- 3 M Na-Acetat: 40,83 g Na-Acetat-3-hydrat mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen; mit CH₃COOH auf pH 4,2 einstellen

Lösungen für die immunhistochemische Untersuchung:

- Fixativ 1: 5 g Paraformaldehyd in 50 ml Aqua bidest. erwärmen und 1 M NaOH zutropfen, bis sich das Paraformaldehyd löst; 2g Sucrose; 20 ml 5x PBS; mit 1 M HCl auf pH 7,3 einstellen; mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen; steril filtrieren
- Fixativ 2: 500 µl NP40; 10 g Sucrose; 1 ml FCS; mit PBS auf 100 ml auffüllen; steril filtrieren
- PBS: 0,14 M (8 g) NaCl, 2,7 mM (0,2 g) KCl; 6,5 mM (2,3 g) Na₂HPO₄ 12x H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄; mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Lösungen für Plaque-Assays:

- Kristallviolett-Formalin-Lösg.: 0,2 % (1) g Kristallviolett
20 % (100 ml) 96 %-iger Ethanol
3,5 % (50 ml) Formaldehyd
350 ml Aqua dest.
- Overlay: 50 % 1 %-iger Agar
45 % MEM/E 2x
5 % FCS

Der Agar muß zuvor bei 100°C verflüssigt und FCS+MEM/E 2x auf 42°C vorgewärmt werden.

dNTP-Ansätze:

1,25 mM dNTP`s:	12,5 µl dTTP
	12,5 µl dCTP
	12,5 µl dGTP
	12,5 µl dATP
	950 µl 10 mM TrisHCl pH 7,4
10 mM dNTP`s:	100 µl dTTP
	100 µl dCTP
	100 µl dGTP
	100 µl dATP
	600 µl 10 mM TrisHCl pH 7,4

Beide Ansätze mussten anschließend gevortext und kurz zentrifugiert werden, bevor sie aliquotiert werden konnten.

4.2. Methoden

4.2.1. Erstellen einer Virusstammsuspension

Eine 150 cm² Zellkulturflasche, die vollständig mit GMK-Zellen bewachsen war, wurde 45 min mit dem Virus bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Zellrasen gewaschen, wieder Medium aufgefüllt und bis zur vollständigen Lyse unter den genannten Bedingungen kultiviert. Es folgte ein dreimaliges Einfrieren bei –80°C und Auftauen sowie anschließend eine Zentrifugation für 5 min bei 6000 U/min. Der Überstand mit dem Virus wurde in Kryoröhrchen bei –80°C aufbewahrt und die Viruskonzentration des Stocks mittels Plaque-Assay ermittelt.

4.2.2. Virustitration mittels Plaquetest

Pro Well wurden 2 ml einer GMK-Zellsuspension (3×10^5 Zellen/ml) in eine 6-Well-Platte ausgesät, so dass am nächsten Tag die Wells fast vollständig zugewachsen waren. Von einer Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-7} wurde mit je 333 µl pro Well infiziert. Als Kontrolle wurde ein mit DMEM befülltes Well mitgeführt. Nach der 45-minütigen Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO₂, während der aller zehn Minuten die Platte geschwenkt werden musste, wurde die Virussuspension abgesaugt und 2 ml Overlay pro Well aufgebracht. Die

Inkubation erfolgte danach für 48 h unter den obengenannten Bedingungen. Anschließend erfolgte die Färbung mit Kristallviolett-Formalin-Lösung (2 ml pro Well), so dass nach dem Ausspülen die Plaques hinsichtlich Größe und Anzahl beurteilt werden konnten. Zur Ermittlung der pfu/ml mussten die Plaques der letzten positiven Verdünnungsstufe gezählt und mit 3 multipliziert werden. Zur Präzisierung des Wertes wurde dieser Versuch mindestens 3x durchgeführt und der Mittelwert der Ergebnisse gebildet.

4.2.3. Virustitration mittels TCID₅₀-Test

Von einer GMK-Zellsuspension mit 1×10^5 Zellen/ml wurden je 100 µl pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach 4 h Inkubation kamen je 50 µl der in einer Zehnerreihe bis 10^{-8} verdünnten Virussuspension (je 4 Wells pro Verdünnungsstufe) hinzu. Als Negativkontrolle wurden 4 mit 50 µl DMEM befüllte Wells mitgeführt, um Kontaminationen ausschließen zu können. Nun erfolgte die Inkubation für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂. Danach konnte das Ergebnis anhand der durch das Virus stattgefundenen Zelllyse abgelesen und nach dem Schema von Reed und Muench ausgewertet werden. Es wurde als logTCID₅₀/50µl Suspension angegeben.

Wurde die Konzentration von Virus in Gewebe untersucht, musste dieses zuvor steril (unter Verwendung von Seesand) zerrieben werden. Anhand der Organgewichte wurde das Volumen des Zerreibungsmediums so errechnet, dass eine 2 %-ige Lösung entstand. Anschließend wurde diese Suspension 3x eingefroren und aufgetaut, um die Viren vollständig aus den Zellen freizusetzen, dann konnte wie oben aufgeführt weiter verfahren werden.

4.2.4. Erstellen einer Wachstumskurve

Eine entsprechende Anzahl mit GMK-Zellen zugewachsener 6-Well-Platten wurde mit je 333 µl Virussuspension, die eine multiplicity of infection (MOI) von 1 darstellten, pro Well infiziert und 45 min bei 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Außerdem wurde als Negativkontrolle ein nur mit 333 µl DMEM befülltes Well mitgeführt. Danach wurden die Wells gewaschen, mit je 2 ml GMK-Medium bedeckt und bei oben genannten Bedingungen aufbewahrt. Zu den Zeitpunkten null, eins bis acht, zwölf, vierundzwanzig und sechsunddreißig Stunden wurden

das Medium und der Zellrasen entnommen und bei -80°C dreimal eingefroren und aufgetaut. Die Viruskonzentrationen wurden mittels TCID_{50} -Test ermittelt.

4.2.5. GM-CSF-Bioassay

Die verwendeten FDC-P1-Zellen sind myeloide Vorläuferzellen der Maus, die sich nur in Anwesenheit von IL-3 und GM-CSF vermehren können.

In eine 96-Well-Platte wurde in jedes Well je 100 μl FDC-P1-Zellsuspension, ohne IL-3 oder GM-CSF im Medium, mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml gefüllt. Ausgenommen war die erste Reihe mit 8 Wells, die als Blank-Werte genutzt werden sollten und daher nur mit Zellmedium befüllt wurden (späterer Leerwert). Danach wurden in je 8 Wells 50 μl murinen GM-CSF's in der jeweiligen Verdünnungsstufe hinzugegeben. Verdünnt wurde ab 0,25 ng/ml absteigend mit je der Hälfte der nächsthöheren Konzentration bis 0,00195 ng/ml. Außerdem wurde eine Achterreihe zwar mit Zellen, aber statt mit GM-CSF mit Zellmedium befüllt. Da die FDC-P1-Zellen von CVB3GM-CSF oder CVB3WT in ihrem Wachstum nicht beeinflusst werden, konnten in je 8 Wells 50 μl 1×10^7 pfu/ml des entsprechenden Virus pipettiert werden, um so die virusproduzierte GM-CSF-Menge bzw. den Vergleichswert mit dem CVB3WT zu erhalten. Nun wurde die Platte 48 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Anhand der Umwandlung von MTT durch die Succinatdehydrogenase in ein Produkt, das eine blaue Farbe hat, konnte die durch GM-CSF induzierte Vermehrung der Zellen registriert werden. Dazu wurden pro Well 10 μl MTT-Lösung (5 ng/ml) zugegeben und 4 h inkubiert. Nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 800/U min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und pro Well 100 μl Lysepuffer (Salzsäure: Isopropanol im Verhältnis 1:25) zugegeben. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurde die Platte 1 h geschüttelt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Anhand der erhaltenen Werte konnte eine Eichkurve erstellt und damit die GM-CSF-Konzentration von 50 μl mit 1×10^7 pfu/ml CVB3GM-CSF ermittelt werden.

4.2.6. RNA-Extraktion

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C , um die empfindliche RNA zu schützen. Die bei -80°C gelagerten Gewebestücke wurden in je 1 ml Lösung I mit dem Ultraturrax homogenisiert, das darauffolgende Scheren der DNA

erfolgte für eine Minute. Nach Zugabe von je 1,3 ml Lösung II mussten die Proben gut gevortext werden. Sie konnten daraufhin 30 min auf Eis gestellt werden. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 10000 U/min (15 min) bildeten sich zwei Phasen, von denen die obere abgenommen und mit einem Volumenteil Isopropanol versetzt wurde. Eine RNA-Fällung wurde durch Lagerung für 2-4 Stunden bei -20°C erreicht. Durch Zentrifugation bei 14000 U/min (30 min) entstand ein Pellet, das nun mit je 300 μl Lösung I und III versetzt wurde. Die Proben konnten nun bei -20°C über Nacht inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden sie 30 min bei 14000 U/min zentrifugiert und 2x mit 0,5 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die Pellets mussten danach 15 min in Vakuum getrocknet und wurden dann in 30 bzw. 50 μl DEPC- H_2O aufgenommen werden. Bevor ihre optische Dichte bei 260 nm gemessen werden konnte, blieben die Proben 30 min auf Eis stehen. Mit Hilfe der optischen Dichte wurde die RNA-Menge pro μl bestimmt. Je 5 μg RNA in 10 μl DEPC- H_2O wurden 1 μl oligo (o)-dT zugefügt und 10 min in 70°C warmem Wasserbad und danach 3 min auf Eis aufbewahrt bevor sie im PCR-Cycler das RT-Programm durchlaufen konnten.

4.2.7. Reverse Transcription (RT)

Mit Hilfe einer retroviralen reversen Transkriptase kann RNA in cDNA umgeschrieben werden. 5 μg der gewonnenen RNA wurden mit DEPC- H_2O auf ein Volumen von 10 μl aufgefüllt und 1 μl o-dT-Primer hinzugegeben. Zur Denaturierung erfolgte eine 10-minütige Inkubation im Wasserbad mit einer Temperatur von 70°C . Dann wurden die Proben 3 min auf Eis aufbewahrt. Folgender Ansatz wurde danach zu jeder Probe zugefügt:

Ansatz: 4 μl 5fach Puffer
 2 μl 0,1 M DTT
 2 μl 10 mM dNTP's
 1 μl Superscript

Unter den Bedingungen des unten aufgeführten Programms erfolgte das Primer-Annealing, der Polymerisationsschritt und die Denaturierung. Die Proben wurden auf Eis gestellt und konnten sofort für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Programm: Raumtemperatur 10 min
 42°C 50 min
 90°C 5 min
 4°C Ende

4.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Programme und Ansätze

Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase können DNA-Moleküle amplifiziert werden. Dazu werden die einzelnen Reaktionsschritte (Denaturierung, Primer-Annealing, DNA-Polymerisation) zyklisch wiederholt. Die Dauer der Schritte, die Temperaturen und die Anzahl der Wiederholungen hängen von der verwendeten cDNA, der Länge des zu amplifizierenden Abschnitts und der Länge der Primer ab. Die Proben wurden auf Eis pipettiert und im PCR-Cycler PTC-200 amplifiziert. Für die durchgeführten PCR's wurden folgende Ansätze und Programme verwendet:

murines β -Aktin:

Ansatz:	27,75 μ l Aqua dest.	Programm:	94°C 5 min
	8 μ l 1,25 mM dNTP's		55°C 5 sec
	5 μ l MgCl ₂		72°C 50 sec
	5 μ l 10x Puffer		94°C 1 min
	1 μ l 3'Primer		davon 30 Zyklen
	1 μ l 5'Primer		72°C 5 min
	0,25 μ l Taq		4°C Ende
	2 μ l RT-Produkt		

VP1:

Ansatz:	29,75 μ l Aqua dest.	Programm:	94°C 5 min
	8 μ l 1 25 mM dNTP's		56°C 50 sec
	3 μ l MgCl ₂		72°C 50 sec
	5 μ l 10x Puffer		94°C 1 min
	1 μ l 3'Primer		davon 30 Zyklen
	1 μ l 5'Primer		72°C 5 min
	0,25 μ l Taq		4°C Ende
	2 μ l RT-Produkt		

GM-CSF:

Ansatz:	27,75 µl Aqua dest.	Programm:	siehe VP1-PCR
	8 µl 1,25 mM dNTP`s		
	5 µl MgCl ₂		
	5 µl 10x Puffer		
	1 µl RZ10 (Primer)		
	1 µl VP4seq (Primer)		
	0,25 µl Taq		
	2 µl RT-Produkt		

Alle Proben wurden gevortext und kurz zentrifugiert, bevor sie in das PCR-Gerät gestellt wurden.

4.2.9. Sequenzierung

Nach der RNA-Extraktion aus einer mit CVB3GM-CSF-infizierten Zellkultur mit dem RNeasy Mini Kit und anschließender RT, wurde die Sequenz für GM-CSF einschließlich der flankierenden Sequenz im Virusgenom mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden 5µl des PCR-Produkts mit 4 µl Sequenziermix und 1 µl RZ10 zusammenpipettiert, gevortext, zentrifugiert (kurz) und in folgendem Programm amplifiziert:

95°C 2 min
95°C 1 min
50°C 45 sec
60°C 4 min
davon 25 Zyklen
4°C Ende.

Zu 10 µl dieses Ansatzes wurden 10 µl 3 M Na-Acetat und 80 µl Aqua bidest. hinzugefügt und gevortext. Nun wurden 250 µl 99,9 %-igen, raumtemperierten Ethanol hinzugegeben und dieses wurde bei 14000 U/min 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 250 µl 70 %-igem, raumtemperierten Ethanol gemischt und bei 14000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet 5 min vakuumgetrocknet. Anschließend konnte es in 20 µl TSR-Puffer aufgenommen, gevortext, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt werden. Die Probe konnte nun in den Sequenzierer gegeben werden.

Für die Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) verwendet, wobei farbstoffmarkierte Didesoxyribonukleotide mit dem sogenannten Cycle Sequencing-Verfahren von einer modifizierten Taq-Polymerase in die wachsende DNA-Kette eingebaut werden. Mit Hilfe einer polymergefüllten Kapillare erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente. Die fluoreszenzmarkierten Fragmente wurden mit einem Kohlendioxidlaser detektiert und die Rohdaten vom Prism 310-Analyseprogramm ausgewertet.

4.2.10. Immunhistochemische Untersuchung

Vor dem Schneiden mussten die Proben mindestens eine halbe Stunde im auf – 20°C vorgekühlten Kryotom gelagert werden, damit sie diese Temperatur annehmen und sich schneiden lassen konnten. Je drei 10 µm dicke Schnitte einer Probe wurden auf einen Objektträger gebracht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Ziegenserum und Saponin/PBS wurden gemischt, so dass eine 5 %-ige Lösung entstand und darin der Primär-AK, ein von der Ziege produzierter AK gegen das aminoterminal Ende des murinen GM-CSF, auf 5 µg/ml verdünnt und bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt werden konnte. Die Schnitte auf den Objektträgern mussten mit einem DAKO-Lackstift umrandet werden, um ein Weglaufen der aufzutragenden Substanzen zu verhindern.

Die Schnitte durften im weiteren Verlauf nicht eintrocknen und wurden deshalb in einer feuchten, dunklen Kammer bei Raumtemperatur behandelt. Es wurden je 50 µl Fixativ 1 pro Schnitt für 10 min aufgebracht und dreimal 2 min mit 1 % FCS/PBS gewaschen. Der Ablauf war mit Fixativ 2 genauso, allerdings wurde es nur 5 min inkubiert, danach wurde zusätzlich mit 0,1 % Saponin/PBS gewaschen. Nun wurden die Schnitte je 40 min lang mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit behandelt, um das endogene Avidin und Biotin zu blockieren, und je dreimal 3 min mit 0,1 % Saponin/PBS gewaschen. Die endogene Peroxidase wurde 5 min geblockt und es wurde ebenfalls mit 0,1 % Saponin/PBS gespült und zweimal 3 min gewaschen. Zum Besetzen unspezifischer Bindungen wurde 20 min lang Serum aufgetropft. Nun konnte der Primär-AK aufgebracht werden, pro Objektträger wurde ein Schnitt statt dessen mit negativ-Kontroll-Serum betropft. Am nächsten Tag wurde mit 0,1 % Saponin/PBS gespült und zweimal

2 min mit PBS gewaschen. Mit dem Sekundär-AK wurde 30 min inkubiert und wieder mit PBS gespült und zweimal 2 min gewaschen. Anschließend konnte der HRP-Streptavidin-Komplex für 30 min aufgebracht werden. In dieser Zeit mussten 1,6 ml Aqua dest., 5 Tropfen 10x Substratpuffer und je 1 Tropfen DABchromogen sowie Peroxidasesubstrat gemischt werden. Nach zweimaligem Waschen (2 min) mit 0,1 % Saponin/PBS und 1 min mit PBS konnte dieses Gemisch für 5 min aufgebracht werden bis eine leichte Braunfärbung auftrat. Dies musste unter Lichtausschluss erfolgen und anschließend mit Aqua dest. gespült werden, um die Färbung zu unterbrechen. Nachdem die Schnitte noch mit Hämatoxin gefärbt und danach 2-4 min mit Leitungswasser abgespült wurden, konnten sie getrocknet und mit Glycerolgelatine eingedeckelt werden.

5. Ergebnisse

5.1. In vitro-Ergebnisse

5.1.1. Virusstammlösung

Nach Anlegen einer CVB3GM-CSF-Virusstammsuspension erfolgte die Bestimmung der Viruskonzentration mittels Plaque-Assay. Im Vergleich der Plaquemorphologien wies dabei das CVB3GM-CSF deutlich kleinere Plaques als CVB3WT auf (siehe Abb. 1). Diese Methode ergab einen Wert von 1×10^7 pfu/ml. Verglichen mit dem CVB3WT, der eine Konzentration von 7×10^7 pfu/ml besitzt, wurde nur ein Siebtel von dessen Endkonzentration erreicht.

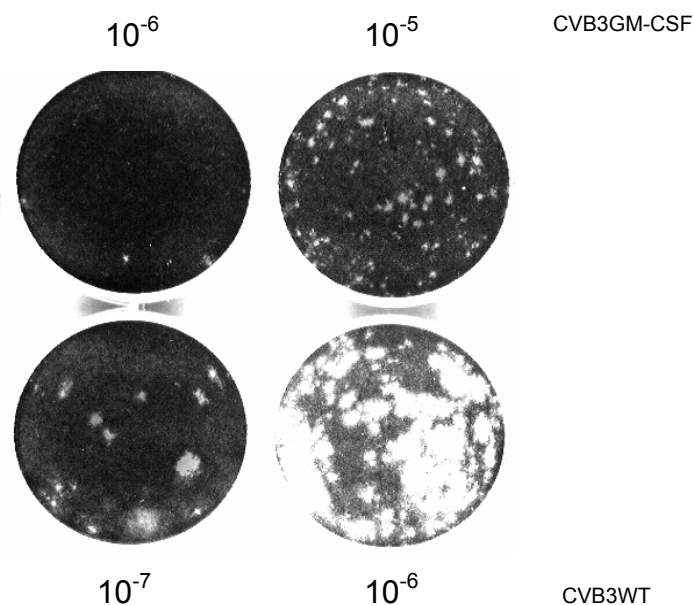


Abb. 1: Plaque-Assay des CVB3GM-CSF bei den Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} , sowie des CVB3WT bei 10^{-6} und 10^{-7} .

5.1.2. Wachstumskurve

Zur Beurteilung der Replikation bietet sich die Erstellung einer Wachstumskurve an. Dies erfolgte im Vergleich von CVB3WT und CVB3GM-CSF. Dabei nahmen beide Kurven einen ähnlichen Gesamtverlauf. Innerhalb der ersten 4 bis 5 Stunden fiel die Viruskonzentration ab, da durch das Uncoating und die ablaufende Replikation das Virus nicht mehr erfassbar war. Danach kam es zu

einem Anstieg, welcher zunächst sehr steil verlief, sich jedoch dann abflachte, bis das Maximum nach circa 12 Stunden erreicht wurde. Auch der anschließende Abfall durch thermische Inaktivierung erfolgte etwa identisch. Jedoch lag das Maximum des CVB3GM-CSF bei einem Wert von $10^{6,7}$ logTCID₅₀/50µl, das des CVB3WT bei $10^{8,8}$. Das entspricht einem Unterschied von etwa zwei Zehnerpotenzen, also einer etwa hundertfach höheren CVB3WT-Konzentration unter Zellkulturbedingungen (siehe Abb. 2).

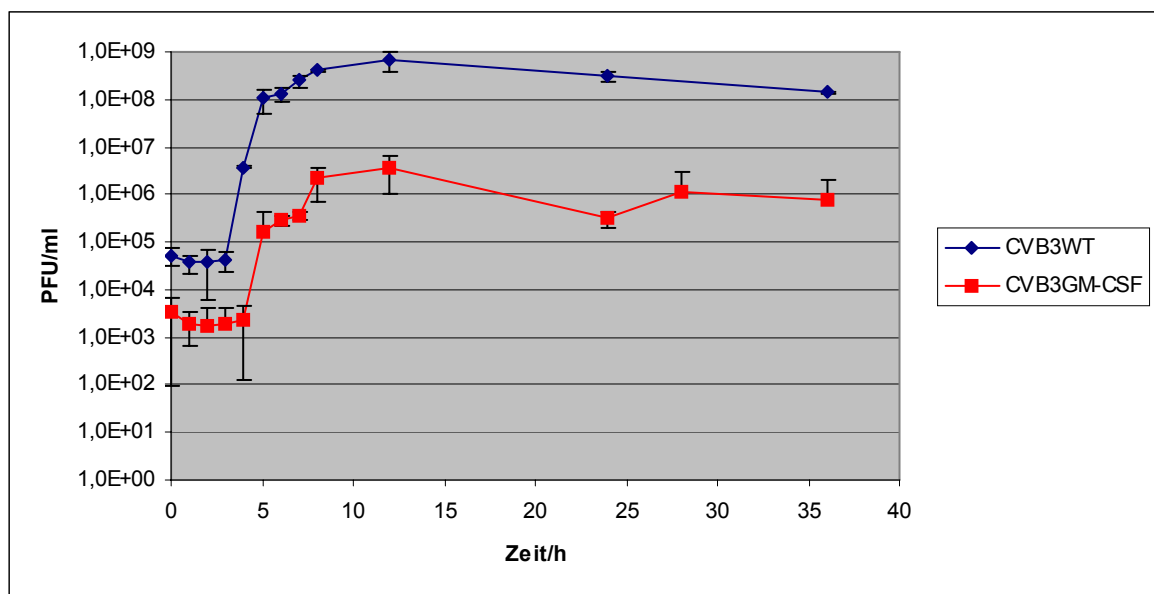


Abb. 2: Wachstumskurven des CVB3WT und des CVB3GM-CSF. Infiziert wurde mit einer MOI von 1.

5.1.3. Sequenzierung

In vorhergehenden Versuchen hatte sich eine Stabilität der GM-CSF-Sequenzinsertion gezeigt. Um diese auch bei dieser erneuten, der 5. Passage, sicherzustellen, erfolgte eine Sequenzierung. Dazu wurde eine dicht mit GMK-Zellen zugewachsene Petrischale mit 5×10^6 pfu CVB3GM-CSF infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 12 h wurde die RNA-Extraktion und RT durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte im Sequenzer und ergab eine korrekte Basenabfolge und intakte Schnittstellen, so konnte eine eventuelle Verfälschung der Ergebnisse durch ein genetisch verändertes und dadurch eventuell inaktives GM-CSF ausgeschlossen werden.

5.1.4. Biologische Wirksamkeit

Zur Bestätigung der biologischen Wirksamkeit des bei der Virusreplikation entstehenden GM-CSF wurde ein Bioassay verwendet.

Hierfür wurden FDC-P1-Zellen, eine myeloische Vorläuferzelllinie, genutzt, welche nur in Anwesenheit von IL-3 oder GM-CSF überleben und sich vermehren können. Unter der Verwendung dieser Zellen konnte ein Assays entwickelt werden, so dass es möglich war, eine Titrationskurve zu erstellen. Darin wurde ersichtlich, dass die Extinktion mit immer höherer GM-CSF-Konzentration ebenfalls stieg (siehe Abb. 3).

Auch ohne die Anwesenheit von Zellen wurde eine gewisse Extinktion (Leerwert) gemessen, die im Mittel einen Wert von 0,015 hatte, was bei den späteren Berechnungen berücksichtigt werden musste. Für den CVB3WT ergab sich ein Wert von 0,017, was etwa dem des Leerwertes entsprach.

Das während der Virusreplikation gebildete CVB3GM-CSF lag mit einer Extinktion von 0,079 innerhalb des Anstiegs der Titrationskurve. Aus den ermittelten Werten wurde eine Regressionsgerade erstellt, anhand derer die GM-CSF-Konzentration bei einem Virustiter von 10^7 pfu/ml berechnet werden konnte. Es ergab sich ein Wert von 0,0163 ng/ml.

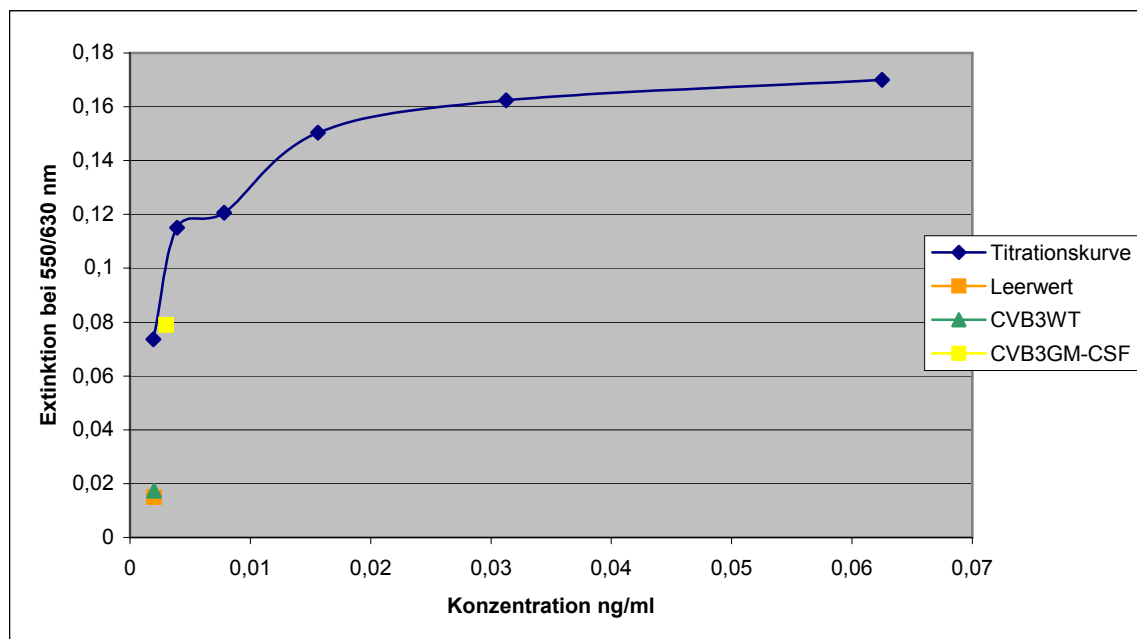


Abb. 3: Titrationskurve zur Bestimmung der GM-CSF-Konzentration von 50 μ l CVB3-GM-CSF mit einem Titer von 10^7 pfu/ml mit Darstellung des gemessenen Extinktionswerte des CVB3WT und des Leerwertes.

5.2. In vivo-Ergebnisse

Um das Verhalten des Virus in vivo beurteilen zu können, wurden 25 Tiere, männliche Balb/c Mäuse, mit 1 Mio. pfu CVB3GM-CSF in 0,2 ml NaCl intraperitoneal infiziert. Einen, zwei, vier, fünf und sieben Tage p.i. wurden je fünf Tiere seziert und Herz, Pankreas sowie Serum entnommen. Herz und Pankreas wurden in 4 Teile zerlegt, um damit eine Virustitration, Immunhistologie, Histologie und RNA-Extraktion durchzuführen, mit dem Serum erfolgte nur die Virustitration.

5.2.1. Virustitration

In Herz und Serum waren zu keinem Zeitpunkt Virus titrierbar. Im Pankreas dagegen waren schon am 1. Tag p.i. Werte messbar. Diese stiegen bis zum 4. Tag p.i. an, an dem sie ihr Maximum erreichten. Der anschließende Abfall der Virustiter führte dazu, dass am 7. Tag p.i. kein Virus mehr mittels dieser Methode nachweisbar war.

Mittels TCID₅₀-Test wurden folgende Werte ermittelt:

Tab. 4: Nachweis von infektiösem Virus mittels TCID₅₀-Test in Herz, Pankreas und Serum der, mit 1×10^6 pfu CVB3GM-CSF/0,2 ml infizierten Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Es wurden pro Tag fünf Tiere untersucht.

	Serum	Herz	Pankreas
1. Tag p.i.	/	/	$10^{3,2} \pm 10^3$
2. Tag p.i.	/	/	$10^{3,7} \pm 10^3$
4. Tag p.i.	/	/	$10^4 \pm 10^4$
5. Tag p.i.	/	/	$10^{2,5} \pm 10^{2,7}$
7. Tag p.i.	/	/	/

5.2.2. RNA-Extraktion

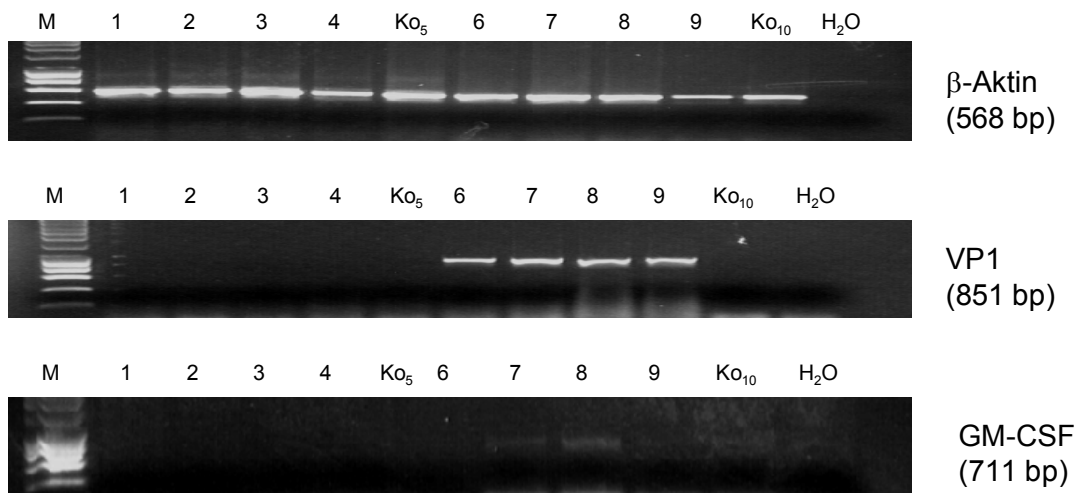
Dieses Verfahren wurde genutzt, um das Virus sensibler zu detektieren. Dazu erfolgte eine RNA-Extraktion mit anschließender RT. Um die Umschreibung der RNA in DNA zu überprüfen, wurde zuerst eine β -Aktin-PCR (568 bp-Bande) durchgeführt. Nachdem diese korrekt erfolgt war und sich die entsprechenden Banden fanden, schloss sich die VP1-PCR (851 bp-Bande) an, die das Virus durch die Amplifikation der genetischen Information für eines seiner Hüllproteine nachweisen konnte. Danach erfolgte die GM-CSF-PCR (711 bp-Bande), um die Sequenz des Zytokins ebenfalls zu detektieren. Dies wurde sowohl mit den Proben vom Herz als auch vom Pankreas durchgeführt. Außerdem wurde als Kontrolle eine nichtinfizierte Maus am ersten Tag p.i. mitgeführt. Daher war bei diesen Proben nur das β -Aktin positiv, VP1 und GM-CSF waren es nicht.

Am ersten Tag p.i. waren die β -Aktin-Proben alle positiv, jedoch fanden sich nur für die Pankreasproben eine Bande in der VP1-PCR, nicht für die Herz- und die Kontrollproben. Nur für die zwei Proben des Pankreas von Maus 3 und 4 konnte eine schwache Bande für die GM-CSF-PCR gesehen werden (siehe Abb. 4).

Auch am zweiten und vierten Tag p.i. waren nur für den Pankreas Amplifikate in der VP1-PCR zu erkennen. Diese Proben waren auch in der GM-CSF-PCR positiv, allerdings waren die Banden vom vierten Tag p.i. z. T. nur schwach (siehe Abb. 5).

Am fünften und siebten Tag p.i. waren nicht alle β -Aktin-Banden positiv. Jedoch konnte in allen Proben eine schwache VP1-Bande erkannt werden, auch in denen der Herzen. In der GM-CSF-PCR waren alle Proben negativ für diese beiden Tage (siehe Abb. 6).

1. Tag p.i.



2. Tag p.i.

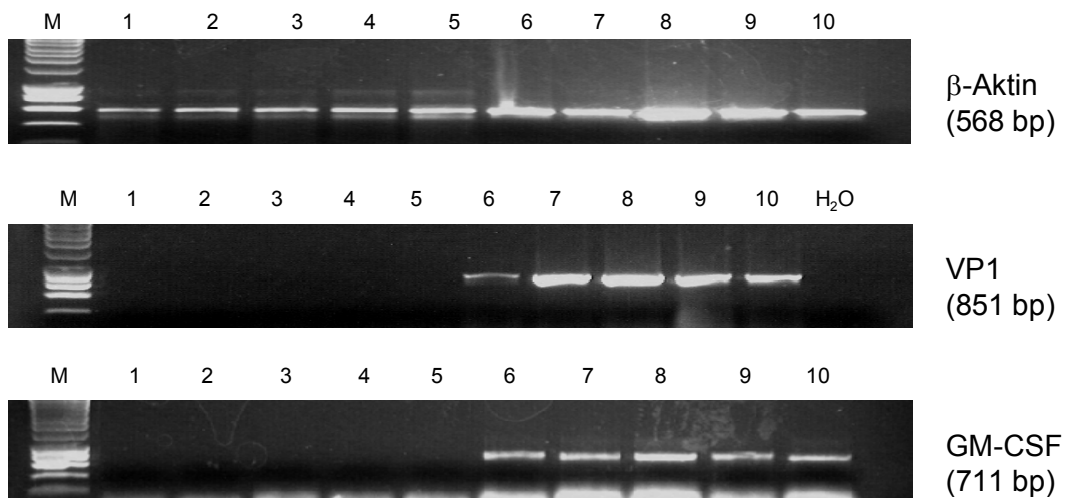


Abb. 4: Darstellung der RT-PCR-Ergebnisse vom 1. und 2. Tag p.i. der mit 1×10^6 pfu CVB3GM-CSF-infizierten Tiere mit dem house keeping Gen β -Aktin, VP1, einem Hüllprotein aller CVB3 und dem murinem GM-CSF.

1. Tag p.i.:

1-4 Herz der Tiere 1-4
 6-9 Pankreas der Tiere 1-4
 Ko₅ Herz der nichtinfizierten Maus
 Ko₁₀ Pankreas der nichtinfizierten Maus
 H₂O Wasserprobe

2. Tag p.i.

1-5 Herz der Tiere 1-5
 6-10 Pankreas der Tiere 1-5
 H₂O Wasserkontrolle

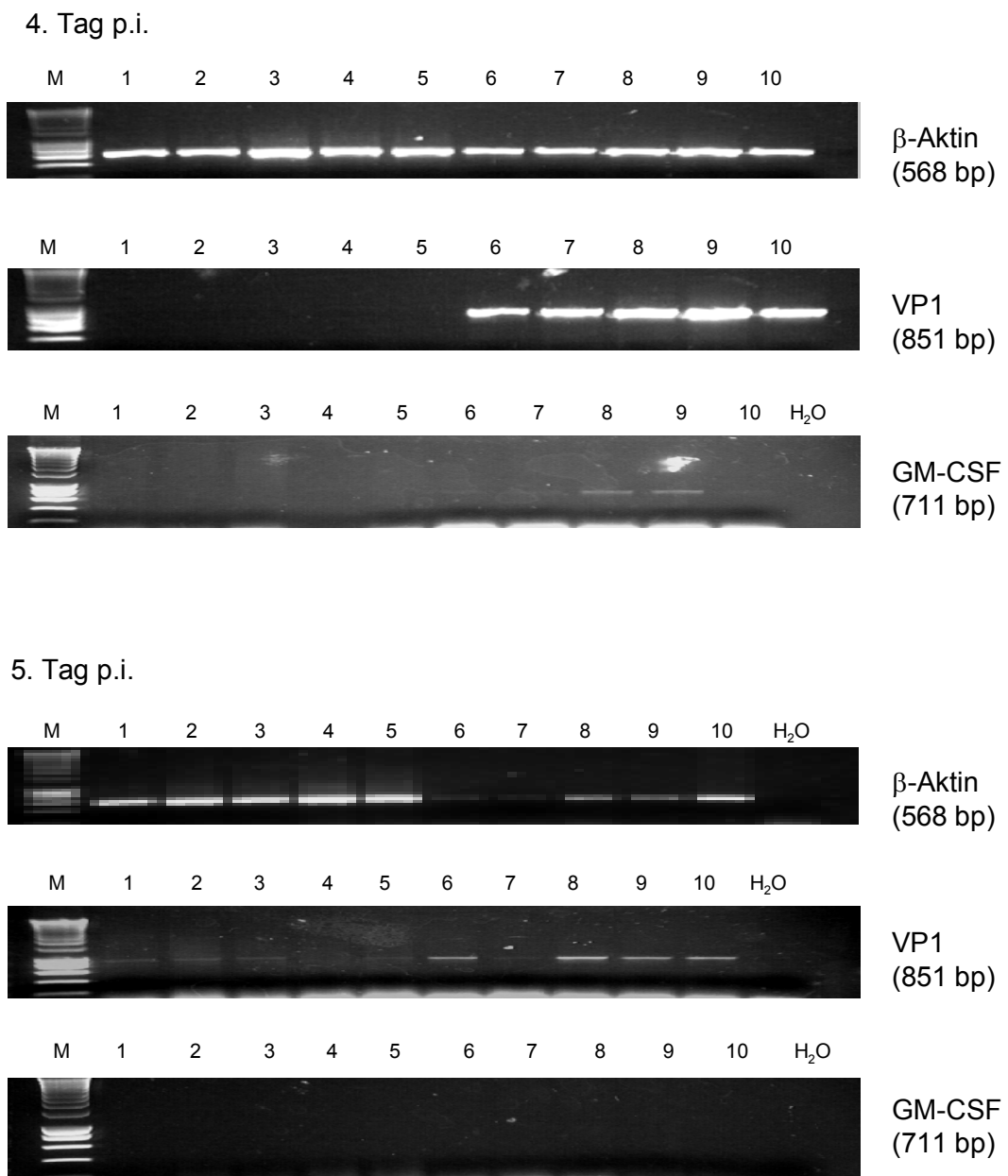


Abb. 5: Darstellung der RT-PCR-Ergebnisse vom 4. und 5. Tag p.i. der mit 1×10^6 pfu CVB3GM-CSF-infizierten Tiere mit dem house keeping Gen β -Aktin, VP1, einem Hüllprotein aller CVB3 und dem murinem GM-CSF.

1-5	Herz der Tiere 1-5
6-10	Pankreas der Tiere 1-5
H ₂ O	Wasserprobe

7. Tag p.i.

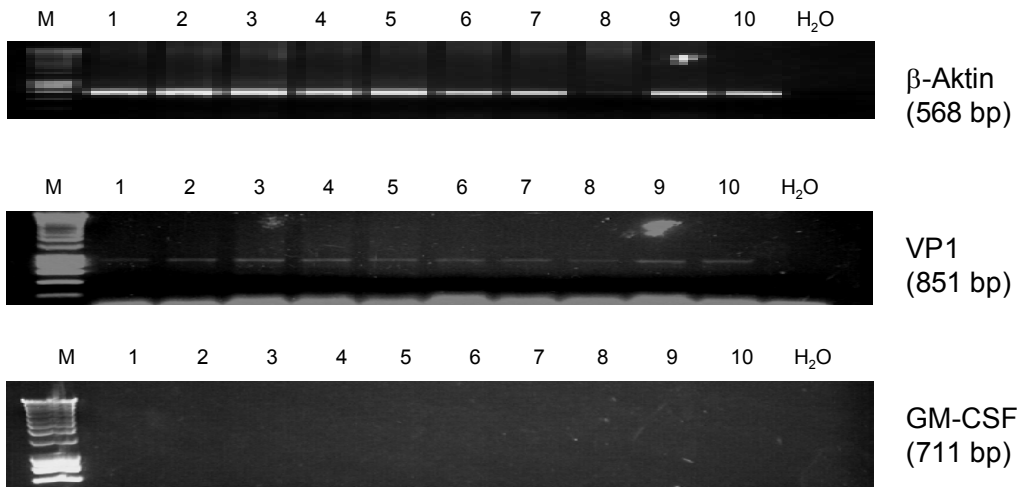


Abb. 6: Darstellung der RT-PCR-Ergebnisse vom 7. Tag p.i. der mit 1×10^6 pfu CVB3GM-CSF-infizierten Tiere mit dem house keeping Gen β -Aktin, VP1, einem Hüllprotein aller CVB3 und dem murinem GM-CSF.

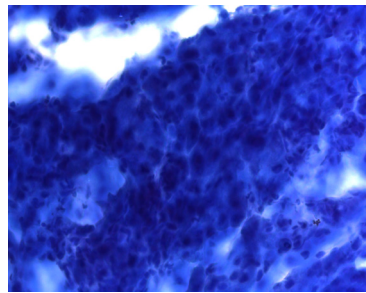
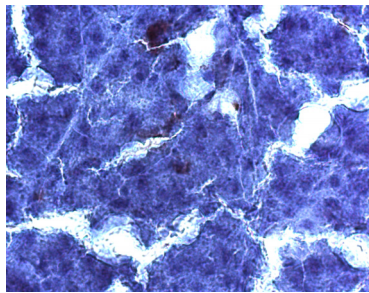
1-5	Herz der Tiere 1-5
6-10	Pankreas der Tiere 1-5
H ₂ O	Wasserprobe

5.2.3. Immunhistologische Untersuchung

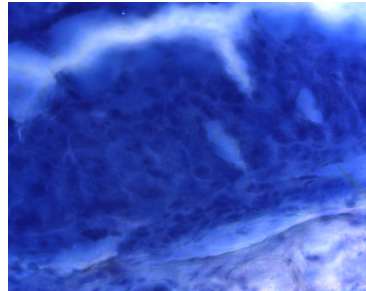
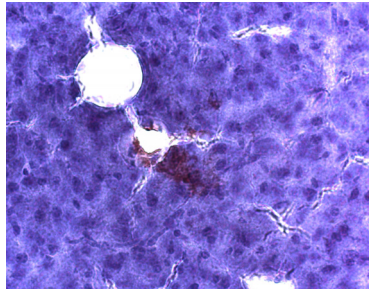
Es wurde ein primärer Antikörper verwendet, der an das amino-terminale Ende des murinen GM-CSF bindet. So konnte dies auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

In den Pankreasschnitten konnte nur für die ersten vier Tage p.i. eine Anfärbung des GM-CSF gefunden werden. Dabei waren jeweils nur kleine Gruppen von wenigen Zellen angefärbt. Trotz mittels TCID₅₀ ermittelten Virus konnte für den fünften Tag p.i. kein GM-CSF-Nachweis durch dieser Methode erfolgen. Der siebte Tag p.i. zeigte entsprechend dem TCID₅₀ auch keine Anfärbung (siehe Abb. 7).

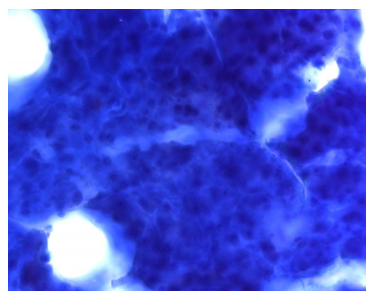
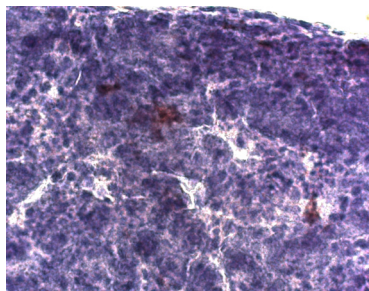
Auf den Schnitten der entnommenen Herzen konnte zu keinem Zeitpunkt GM-CSF nachgewiesen werden (siehe Abb. 8).



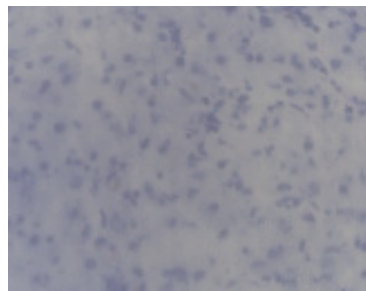
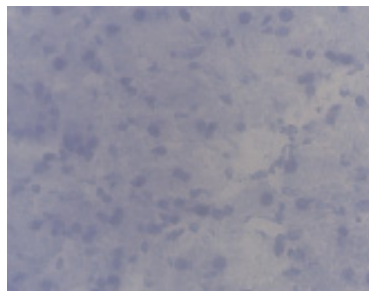
1. Tag p.i.



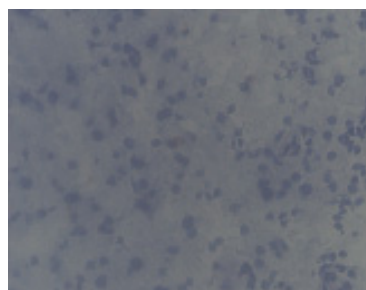
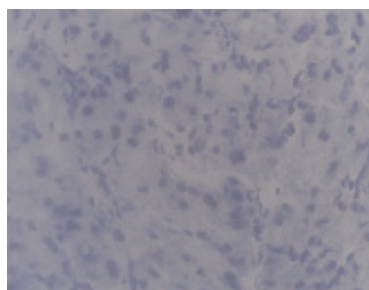
2. Tag p.i.



4. Tag p.i.



5. Tag p.i.



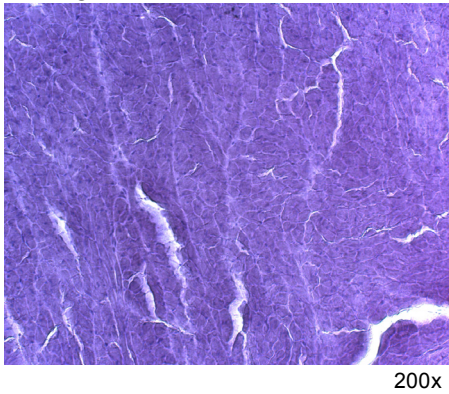
7. Tag p.i.

Spezifische Färbung 630x

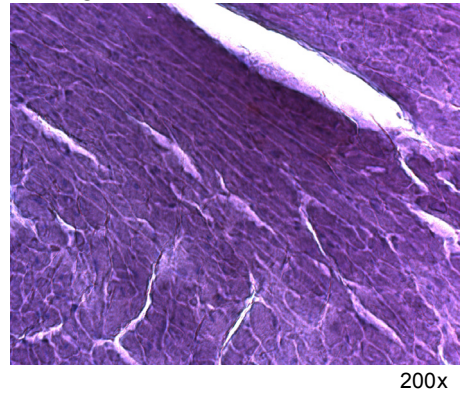
Kontrolle 630x

Abb. 7: Ergebnisse der GM-CSF-Immunhistologie des Pankreas vom 1. bis 7. Tag p.i. der mit 1×10^6 pfu CVB3GM-CSF-infizierten Tiere. Dargestellt sind jeweils die spezifische Färbung sowie die nicht mit Primär-AK inkubierten Schnitte (Kontrollen).

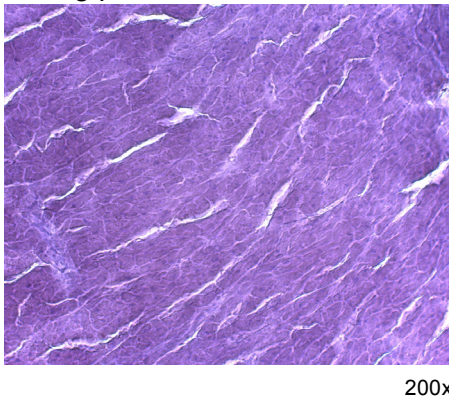
1. Tag p.i.



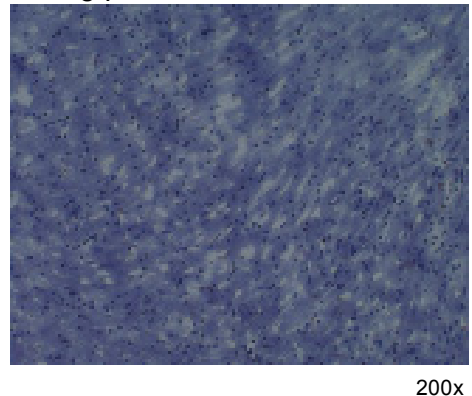
2. Tag p.i.



4. Tag p.i.



5. Tag p.i.



7. Tag p.i.

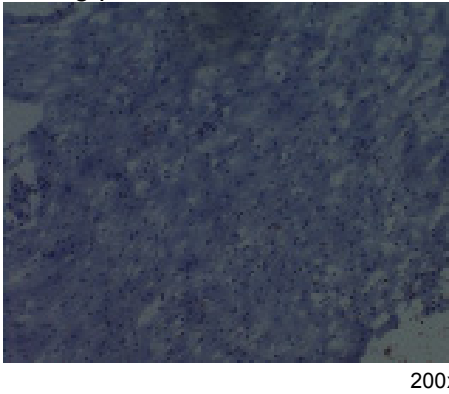


Abb. 8: Ergebnisse der GM-CSF-Immunhistologie der Herzen vom 1. bis 7. Tag p.i.
Dargestellt sind nur die spezifischen Anfärbungen.

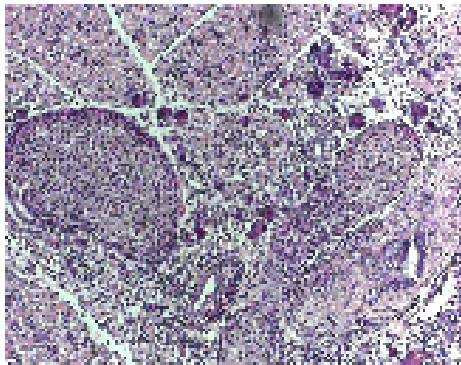
5.2.4. Histologische Untersuchung

Um Herz und Pankreas hinsichtlich Organzerstörung und Entzündungsparametern beurteilen zu können, wurden in Paraffin eingebettete, HE-gefärbte Schnitte der mit CVB3GM-CSF-infizierten Tiere untersucht. Diese wurden mit denen der CVB3WT-infizierten Tiere verglichen.

Im Pankreas der CVB3GM-CSF-infizierten Mäuse konnte schon am ersten Tag p.i. Entzündungsinfiltrate gesehen werden, die sich im Vergleich zum zweiten Tag p.i. kaum oder nur wenig geringer ausgeprägt zeigten. Besonders am vierten Tag p.i. waren sehr deutlich Infiltrate im exokrinen Pankreas zu erkennen. Ab dem fünften Tag p.i. gingen die Infiltrate wieder zurück und wurden nun durch rundkernige Zellen dominiert. Im Gesamteindruck wurde nur ein geringer Teil des Pankreas zerstört, die Hauptmasse blieb jedoch intakt (siehe Abb. 9 und 10). Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der CVB3WT-infizierten Mäuse, zeigte sich bei diesen Tieren schon ab dem ersten Tag p.i. Infiltrate, die besonders ab dem folgenden Tag mit Nekrosen einhergingen, welche im Verlauf der Infektion durch Fettgewebe ersetzt wurden. Ab dem fünften Tag p.i. war die Dominanz von Fettgewebe besonders gut zu erkennen. Am siebten Tag p.i. war das gesamte exokrine Pankreas zerstört, so dass nur noch die Langerhans'schen Inseln existierten (siehe Abb. 9 und 10). Dieses Organ wurde beim CVB3WT komplett bis auf das endokrine Gewebe zerstört, beim CVB3GM-CSF blieb die Entzündung auf einzelne Areale begrenzt und ließ das Organ relativ intakt erscheinen.

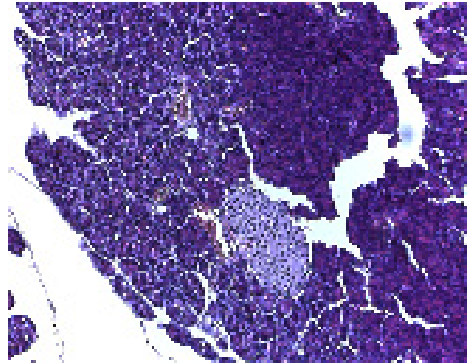
Im Herzen der CVB3GM-CSF-infizierten Tiere waren zu keinem Zeitpunkt Infiltrate und Nekrosen zu sehen, das Gewebe sah intakt und normal strukturiert aus (siehe Abb. 11 und 12). Außerdem fanden sich in zusätzlichen, siriusrotgefärbten Schnitten keine Anzeichen einer pathologischen Bindegewebsbildung im Sinne einer beginnenden Fibrosierung (nicht dargestellt). Im Vergleich dazu waren ab dem fünften Tag p.i. bei den CVB3WT-infizierten Tieren Infiltrate und Myozytennekrosen zu sehen. Besonders stark ausgeprägt waren die Infiltrate am siebten Tag p.i. und sie gingen mit einer verstärkten Zellzerstörung einher (siehe Abb. 11).

1. Tag p.i.



CVB3WT

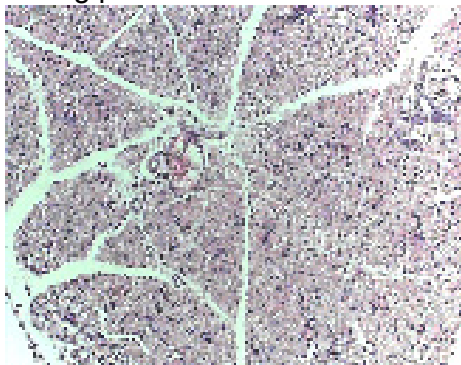
200x



CVB3GM-CSF

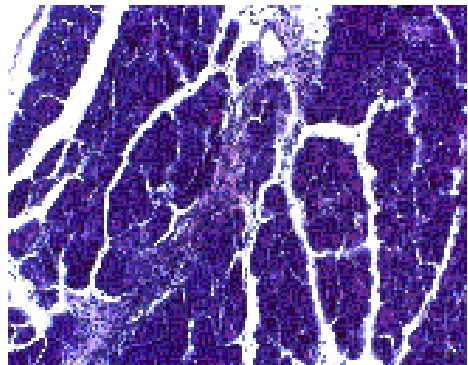
200x

2. Tag p.i.



CVB3WT

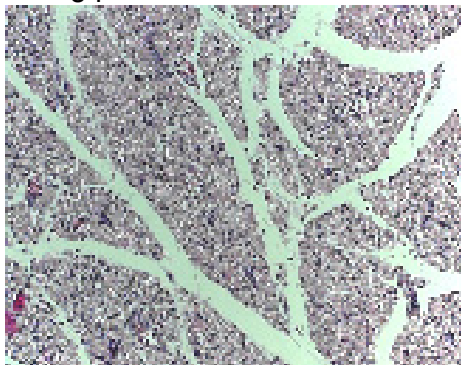
200x



CVB3GM-CSF

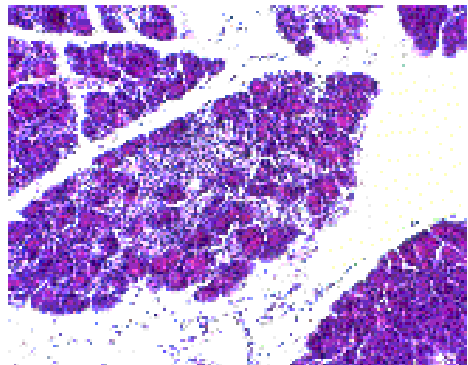
200x

4. Tag p.i.



CVB3WT

200x

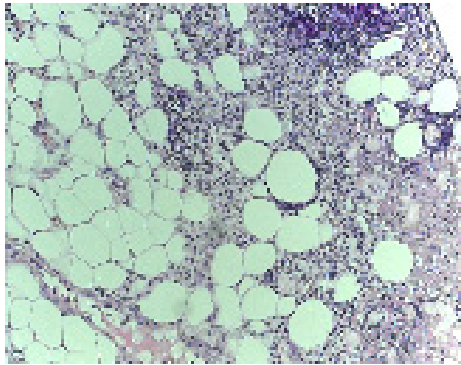


CVB3GM-CSF

200x

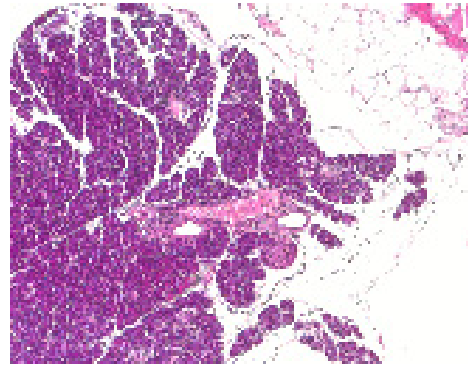
Abb. 9: Histologie des Pankreas der mit 1×10^6 pfu CVB3GM-CSF/0,2 ml intraperitoneal infizierten Tiere, sowie der mit 1×10^6 pfu CVB3WT-infizierten Mäuse.

5. Tag p.i.



CVB3WT

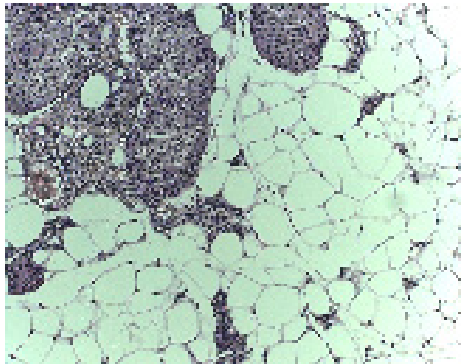
200x



CVB3GM-CSF

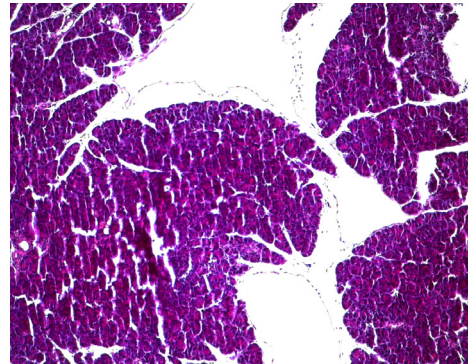
200x

7. Tag p.i.



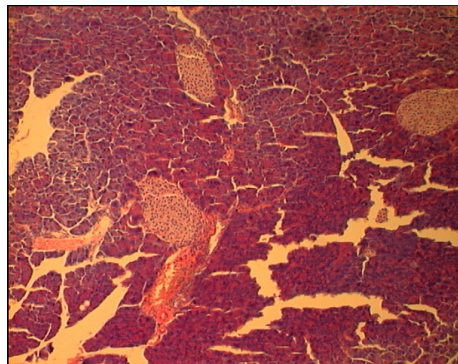
CVB3WT

200x



CVB3GM-CSF

200x

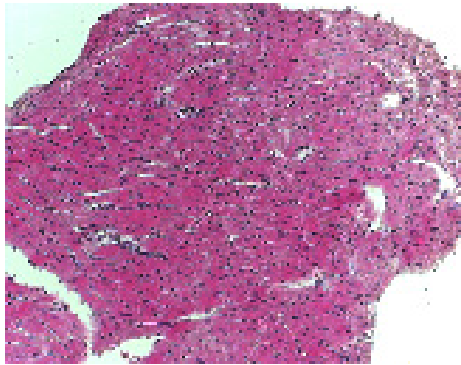


Nichtinfizierte Kontrolle

200x

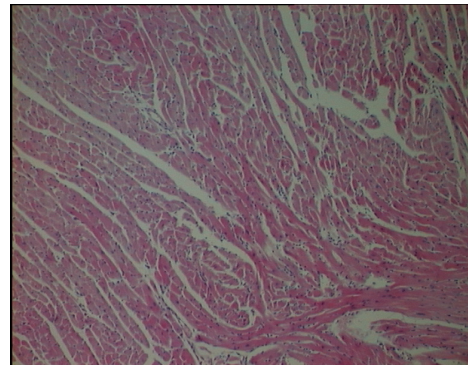
Abb. 10: Histologie des Pankreas der mit 1×10^6 pfu CVB3GM-CSF/0,2 ml intraperitoneal infizierten Tiere, sowie der mit 1×10^6 pfu CVB3WT-infizierten Mäuse vom 5. und 7.Tag p.i. sowie einer nichtinfizierten Maus.

1. Tag p.i.



CVB3WT

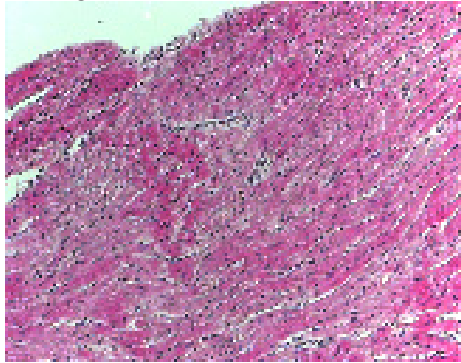
100x



CVB3GM-CSF

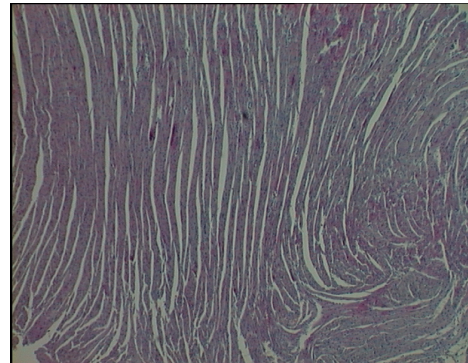
100x

2. Tag p.i.



CVB3WT

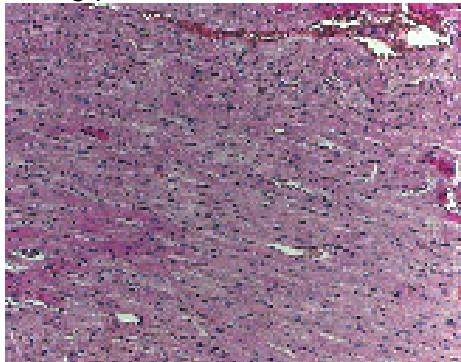
100x



CVB3GM-CSF

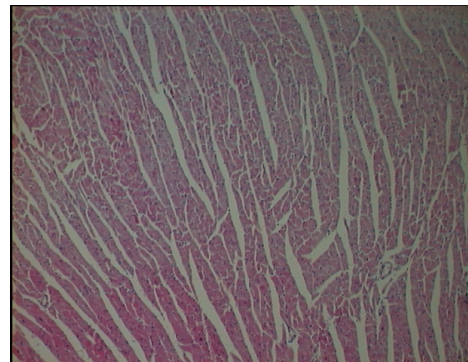
100x

4. Tag p.i.



CVB3WT

100x

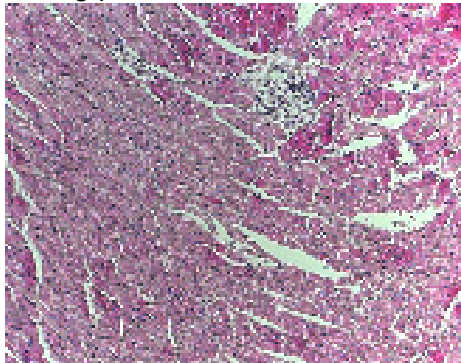


CVB3GM-CSF

100x

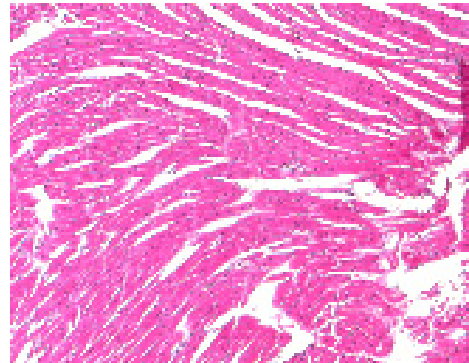
Abb. 11: Histologie der Herzen vom 1. bis 4. Tag p.i. der mit 1×10^6 pfu CVB3WT- bzw. CVB3GM-CSF-infizierten Tiere.

5. Tag p.i.



CVB3WT

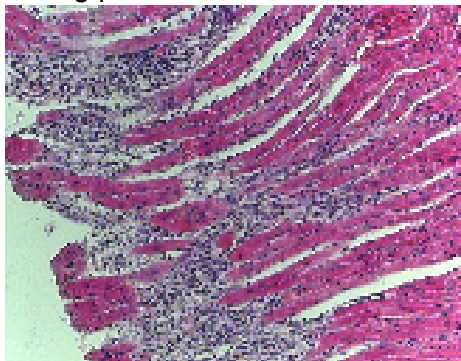
200x



CVB3GM-CSF

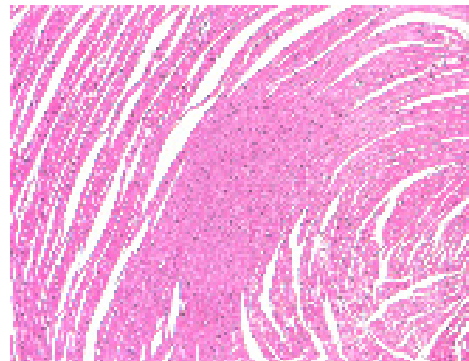
200x

7. Tag p.i.



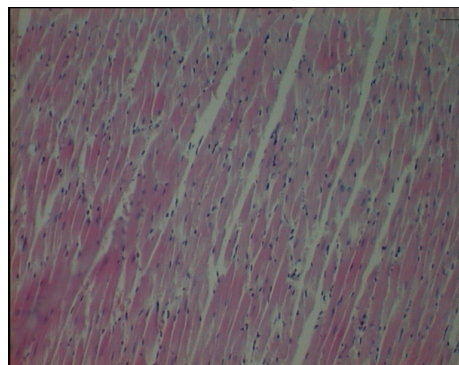
CVB3WT

200x



CVB3GM-CSF

200x



Nichtinfizierte Kontrolle

200x

Abb. 12: Histologie der Herzen vom 5. und 7. Tag p.i. mit deutlichen Destruktionen und Infiltraten bei den CVB3WT-infizierten Tieren und keinen pathologischen Veränderungen der CVB3GM-CSF-infizierten Tiere.

5.3. Infektionsversuche

5.3.1. Direkte protektive Wirkung

Es wurden 6 männliche Balb/c-Mäuse 1×10^6 pfu des CVB3GM-CSF in 0,2 ml intraperitoneal inokuliert. Einen Tag nach der Infektion wurden die Mäuse mit 100 LD₅₀ des CVB3H3, einer für diese Mäuse besonders pathogenen Variante, infiziert. Die Überlebensrate der Tiere in den anschließenden 4 Wochen wurde beurteilt und deren Pankreas histologisch aufgearbeitet.

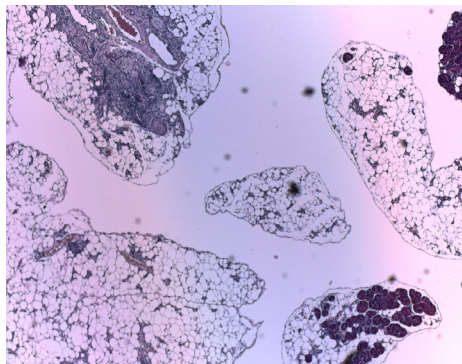
Es überlebten 4 der 6 infizierten Tiere, was einer Quote von **66,7%** entspricht. Mäuse, die zuvor mit CVB3WT statt CVB3GM-CSF infiziert wurden, überlebten zu 12,5 %. Wurden die Tiere vor der Infektion mit CVB3H3 nicht mit einem anderen Virus oder mit CVB3H3EGFP infiziert, verstarben alle Tiere.

Das Pankreas der überlebenden Mäuse, die mit CVB3GM-CSF infiziert wurden, zeigte nur noch vereinzelt intaktes exokrines Gewebe. Es dominierte Fettgewebe, das ein Ersatz für das nekrotische Pankreasgewebe war, außerdem waren Infiltrate von Entzündungszellen innerhalb des Fettgewebes zu erkennen. Insgesamt wirkte das Pankreas stark zerstört, allerdings fanden sich immer noch kleine Inseln intakten exokrinen Gewebes. Auch hier wurden die Langerhans'schen Inseln nicht angegriffen (siehe Abb. 13).

5.3.2. Indirekte protektive Wirkung

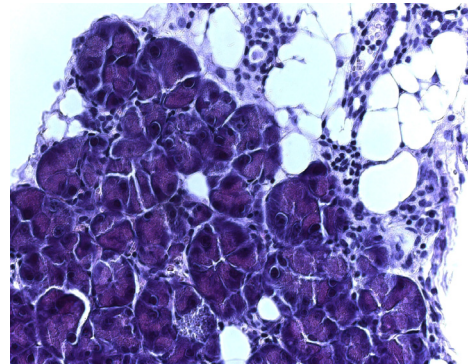
Bei einem zweiten Versuch wurden wieder 6 männliche Balb/c-Mäuse mit 1×10^6 pfu CVB3GM-CSF in 0,2 ml intraperitoneal infiziert. Nach 3 Wochen wurden diesen Tieren 5 LD₅₀ des CVB3H3 injiziert. Auch hier wurde das Überleben der Mäuse im Verlauf von 4 Wochen beobachtet und danach das Pankreas histologisch untersucht. Unter diesen Bedingungen überlebten alle Versuchstiere, also **100%**, bis zum Ende der vier Wochen. Wurden die Mäuse mit CVB3WT oder CVB3H3EGFP statt CVB3GM-CSF infiziert, überlebten sie zu 48,9 % bzw. 44,8 %. Wurden die Mäuse vor der Inokulation von CVB3H3 kein Virus injiziert, verstarben alle.

Hier fanden sich geringere Infiltrate, als im ersten Challengeversuch, vereinzelt war auch Fettgewebe zu finden. Insgesamt erschien das Pankreas bis auf kleine Herde intakt und normal strukturiert (siehe Abb. 14).



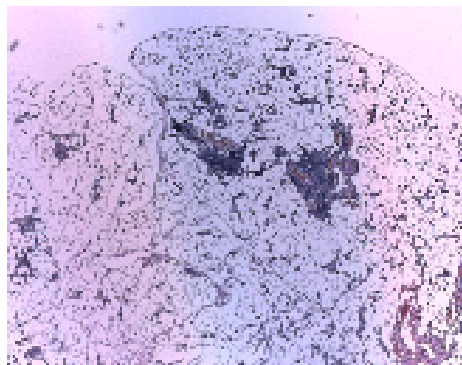
Maus 1

50x



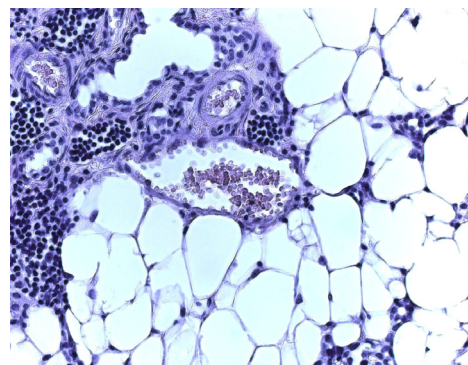
Intaktes exokrines Pankreas

400x



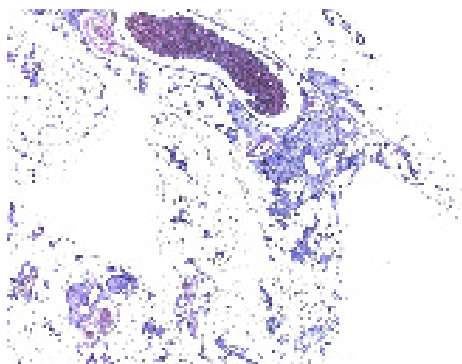
Maus 2

50x



Fettgewebe mit Infiltrat

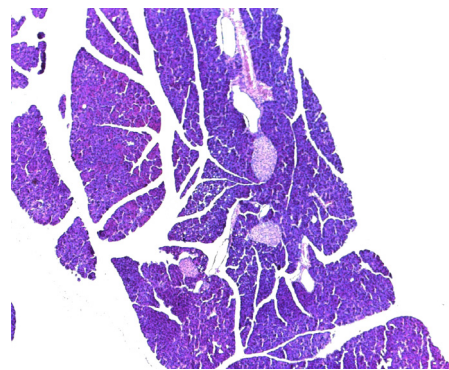
400x



Maus 3

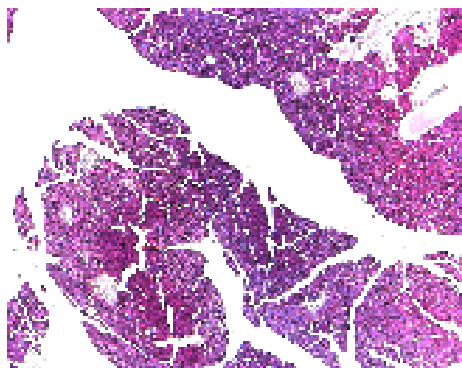
50x

Abb. 13: Histologie des Pankreas der nach 1 Tag mit 100 LD₅₀CVB3H3-infizierten Tiere mit Ausschnittsvergrößerung von Fettgewebe mit Infiltraten sowie noch intaktem exokrinen Pankreas.



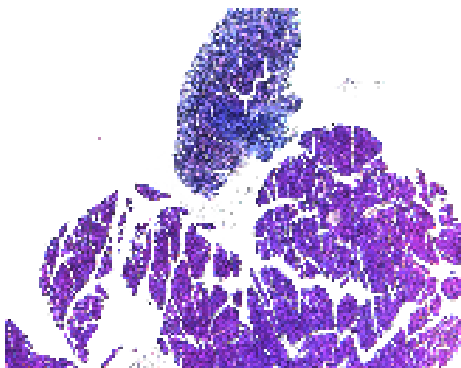
Maus 1

50x



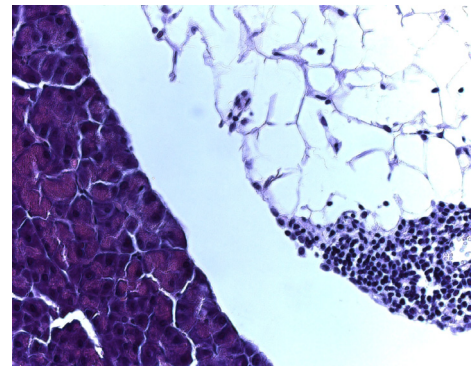
Maus 2

50x



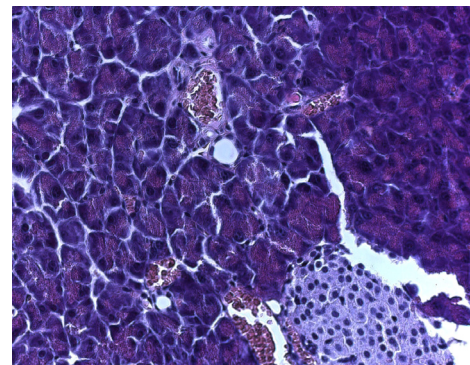
Maus 3

50x



Fettgewebe und Infiltrat neben intaktem Pankreas

400x



Intaktes exokrines und endokrines Pankreas

400x

Abb. 14: Histologie des Pankreas der nach 3 Wochen mit 5 LD₅₀ CVB3H3-infizierten Tiere. In den Übersichtsaufnahmen (50x) ist normal strukturiertes Gewebe zu erkennen. Die Vergrößerungen zeigen intaktes Pankreas sowie kleine Inseln von Fettgewebe und Infiltraten.

5.4. Koinfektionsversuche

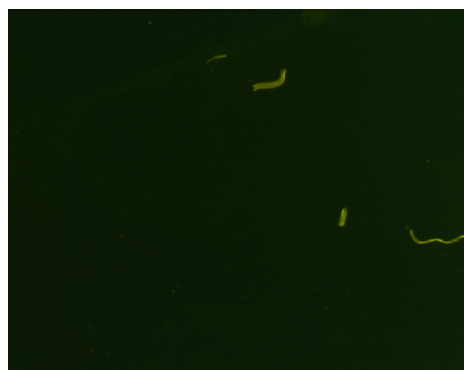
5.4.1. Koinfektion mit CVB3H3EGFP in vitro

Wird eine Zelle mit CVB3H3EGFP infiziert, so kann dies unter dem Fluoreszenzmikroskop gesehen werden, da sie dann durch das bei der Replikation entstehende EGFP grün leuchtet. Bei einer CVB3GM-CSF-Infektion ist keine Fluoreszenz zu erkennen.

Je ein GMK-Zellrasen wurde mit 2×10^5 pfu CVB3H3EGFP und ansteigenden Dosen CVB3GM-CSF infiziert, um eine eventuelle gegenseitige Beeinflussung der Viren zu erkennen. Dies wurde ausgewertet, indem unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt wurde, wie viel grün leuchtende, also CVB3H3EGFP-infizierte Zellen, bei den unterschiedlich hohen zugegebenen CVB3GM-CSF-Dosen zu finden waren. Außerdem wurden zur Kontrolle nichtinfizierte (DMEM) sowie nur mit 1×10^5 pfu CVB3GM-CSF bzw. nur mit 2×10^5 pfu CVB3H3EGFP infizierte Zellrasen mitgeführt.

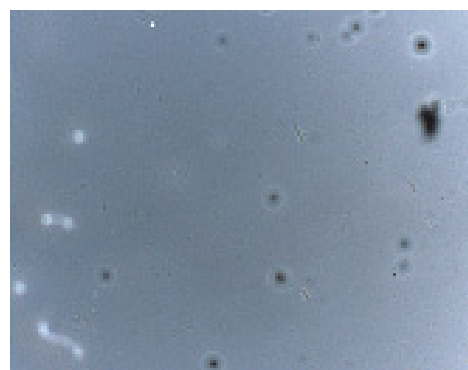
Im Vergleich der Kontrollen (DMEM, nur EGFP, nur GM-CSF) konnte eine deutliche Grünfluoreszenz der CVB3H3EGFP-infizierten Zellen erkannt werden. In der nichtinfizierten Kontrolle (DMEM) war überhaupt keine Fluoreszenz zu sehen im Gegensatz zu den mit GM-CSF-infizierten Zellen, welche eine ganz leichte Eigenfluoreszenz aufwiesen, die jedoch deutlich vom eigentlichen EGFP zu unterscheiden und auch nur in größerer Beleuchtungsstärke zu erkennen war (siehe Abb. 15). Rechts stehen immer die entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahmen, die zeigen, dass man die Fluoreszenz auch eindeutig bestimmten Zellen zuordnen kann.

Bei der Auswertung des Experiments, war bei den beiden niedrigsten CVB3GM-CSF-Konzentrationen, die zugegeben wurden, noch kein Unterschied zu der EGFP-Kontrolle zu erkennen; im Überblick waren etwa genauso viel grün leuchtende Zellen zu sehen. Dies blieb so bis zu einer CVB3GM-CSF-Konzentration von $0,5 \times 10^6$ pfu. Wurde die Konzentration weiter auf 1×10^6 bis 1×10^7 pfu gesteigert, war eine deutliche Verminderung der grün leuchtenden Zellen zu erkennen. Dies entsprach einer geringeren Zahl an CVB3H3EGFP-infizierten Zellen, die durch ihre Fluoreszenz markiert waren (siehe Abb. 16).



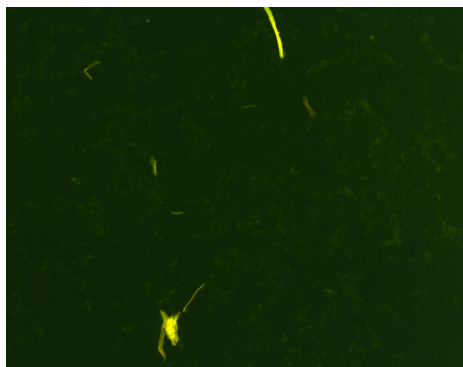
DMEM

100x



Lichtmikroskop

100x



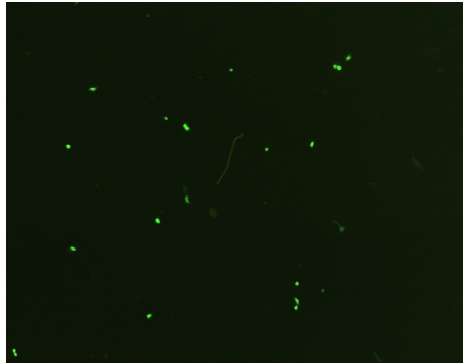
CVB3GM-CSF 1×10^5 pfu

100x



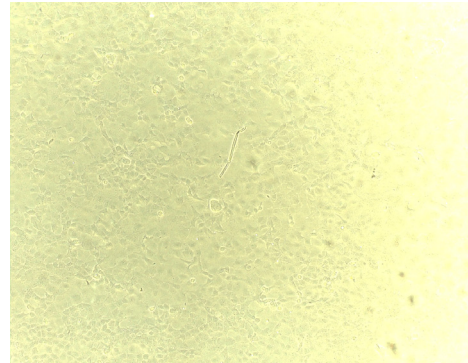
Lichtmikroskop

100x



CVB3H3EGFP 2×10^5 pfu

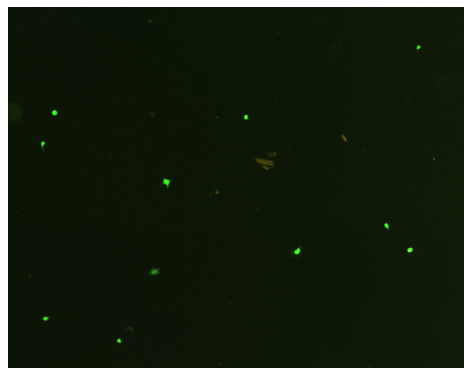
100x



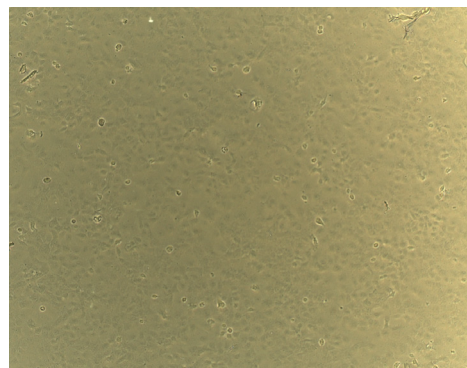
Lichtmikroskop

100x

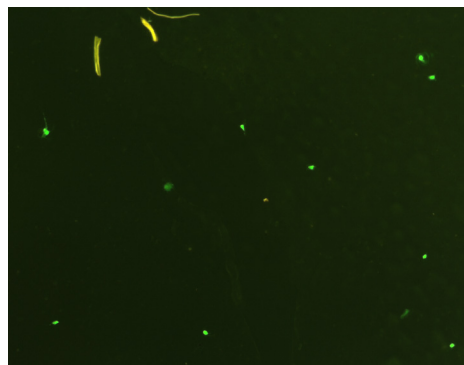
Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopie der mit den entsprechenden Viruskonzentrationen infizierten Zellrasen und dem mit DMEM bedeckten Zellrasen.



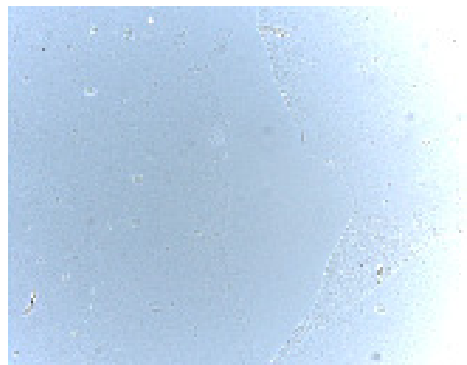
+ $0,5 \times 10^5$ pfu CVB3GM-CSF 100x



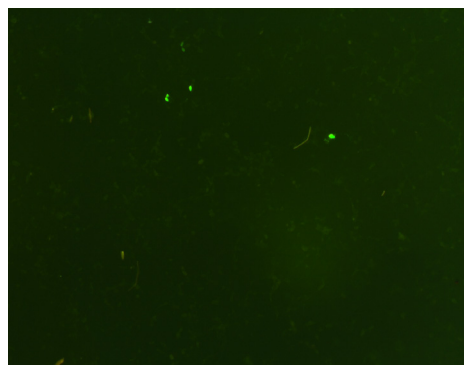
Lichtmikroskop 100x



+ $0,5 \times 10^6$ pfu CVB3GM-CSF 100x



Lichtmikroskop 100x



+ 1×10^7 pfu CVB3GM-CSF 100x



Lichtmikroskop 100x

Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopie der Zellrasen, die zusätzlich zu 2×10^5 pfu CVB3H3EGFP die, unter den Bildern aufgeführten Konzentrationen an CVB3GM-CSF erhielten.

5.4.2. Koinfektion mit CVB3H3EGFP in vivo

26 männliche C57BL/6 Mäuse wurden in eine Kontrollgruppe mit 2 Tieren und 3 Gruppen zu je 8 Tieren eingeteilt. Den Kontrolltieren wurde isotonische Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert und 3 Tage p.i. seziert, was dem ersten Tag p.i. der infizierten Tiere entspricht.

Von den übrigen Tieren wurden je acht 1×10^6 pfu CVB3IFN- γ bzw. 1×10^6 pfu CVB3GM-CSF intraperitoneal injiziert. Acht Mäuse blieben uninfiziert. Zwei Tage später wurden diesen 24 Tiere 1×10^6 pfu CVB3H3EGFP inokuliert. Für die ersten beiden Achtergruppen erfolgte somit eine Koinfektion, die dritte Mausgruppe diente als Kontrolle, um die Infektion nur mit dem CVB3H3EGFP beurteilen zu können.

Je zwei Mäuse dieser drei Gruppen wurden ein, zwei, drei, und vier Tage p.i. seziert. Ihnen wurden Herz, Milz und Pankreas entnommen, um sie für die Virustitration, histologische Untersuchung, RNA-Extraktion und Gefrierschnitte zu verwenden.

5.4.2.1. Virustitration

Mittels TCID₅₀-Test wurde infektiöses Virus nachgewiesen. Dies war im Serum, Herz und Milz zu keinem Zeitpunkt und in keiner Gruppe möglich. Am ersten Tag p.i. hatte noch die Gruppe der mit CVB3GM-CSF-vorinfizierten Tiere die höchsten Titer, die nur mit CVB3H3EGFP-infizierte hatte die geringsten, da diese nur ein Virus inokuliert bekam. Alle drei Achtergruppen hatten am zweiten Tag p.i. ihre höchste Viruslast im Pankreas, die an den darauffolgenden Tagen bei allen abfiel. Dabei wies die nur mit CVB3H3EGFP-infizierte Gruppe zu diesen Zeitpunkten die höchsten Titer auf. Die beiden Achtergruppen, die noch zusätzlich ein anderes rekombinantes Virus erhielten hatten an diesen Tagen niedrigere Werte, obwohl sie zweimal Virus injiziert bekommen hatten. Dabei erreichte die Gruppe, die CVB3IFN- γ erhalten hatte noch niedrigere Werte, als die Gruppe, die CVB3GM-CSF zusätzlich erhalten hatte (siehe Tab. 5).

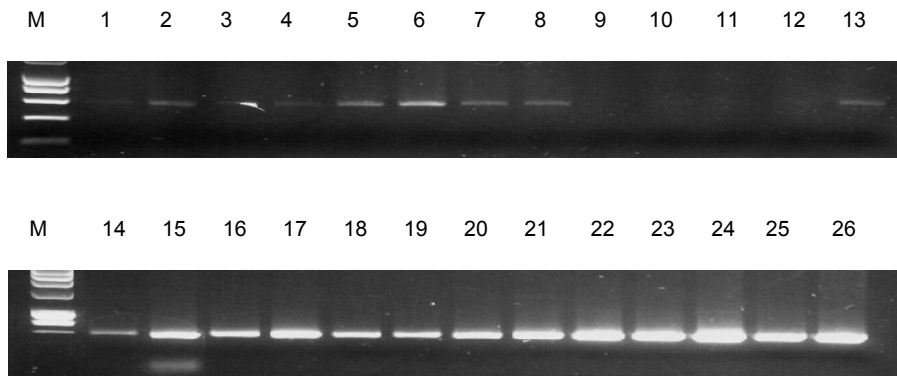
Tab. 5: Nachweis infektiösen Virus im Pankreas mittels TCID₅₀-Test. Dargestellt sind die Mittelwerte.

	1. Tag p.i.	2. Tag p.i.	3. Tag p.i.	4. Tag p.i.
CVB3H3EGFP	$10^{4,1}$	$10^{6,8}$	$10^{6,3}$	$10^{5,33}$
CVB3H3EGFP+ CVB3GM-CSF	$10^{5,33}$	$10^{4,4}$	$10^{3,5}$	$10^{2,2}$
CVB3H3EGFP+ CVB3IFN- γ	$10^{4,2}$	$10^{3,7}$	$10^{3,3}$	<1

5.4.2.2. RNA-Extraktion

In Herz und Milz war das β -Aktin bei allen Proben positiv. In der VP1-PCR ergaben sich weder für Herz noch für Pankreas Banden (nicht gezeigt), im Pankreas konnte allerdings nur unregelmäßig β -Aktin gesehen werden, besonders für die ersten beiden Tage p.i. Auch das VP1 ließ sich nicht entsprechend den β -Aktin-Ergebnissen nachweisen. So waren in Proben trotz positivem β -Aktin-Nachweis keine Banden in der VP1-PCR zu erhalten, obwohl in der Titration infektiöses Virus nachgewiesen werden konnte. Daher wurde auf weitere spezifische PCR's verzichtet (siehe Abb. 17).

β-Aktin (568 bp)



VP1 (851 bp)

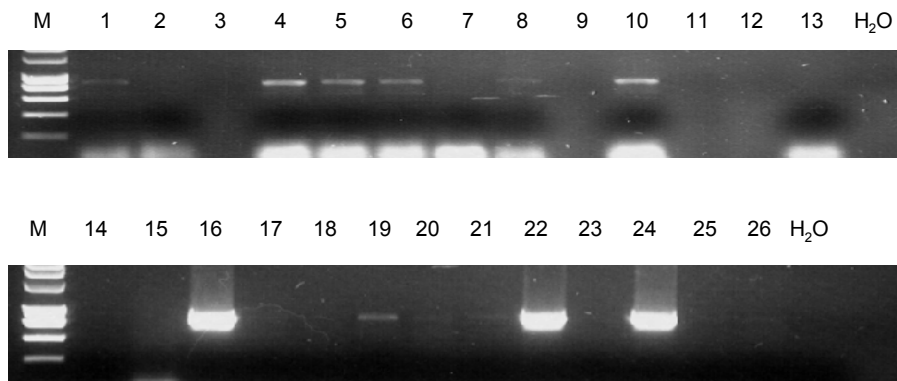


Abb. 17: Ergebnisse der RT-PCR des Pankreas vom 1. bis 4. Tag p.i. mit dem house keeping Gen β-Aktin und dem Hüllprotein VP1.

M	Marker				
1/2	nichtinfizierte Kontrollen				
		1. Tag p.i.	2. Tag p.i.	3. Tag p.i.	4. Tag p.i.
CVB3H3EGFP		3/4	9/10	15/16	21/22
+ CVB3GM-CSF		5/6	11/12	17/18	23/24
+ CVB3IFN-γ		7/8	13/14	19/20	25/26

5.4.2.3. Untersuchung mittels Gefrierschnitten

Es wurden von allen Organen Gefrierschnitte von 10 µm Dicke angefertigt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, um mit CVB3H3EGFP-infizierte Zellen anhand ihrer Fluoreszenz zu identifizieren.

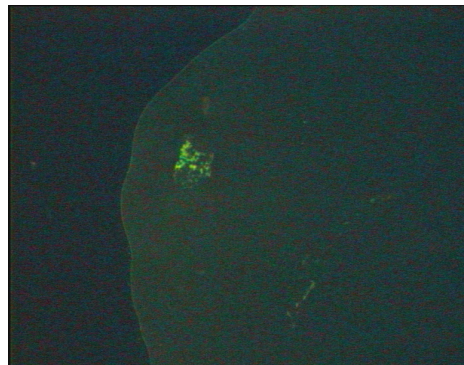
Sowohl in Herz als auch in Milz wurden keine grün fluoreszierenden Areale gefunden, was keinen CVB3H3EGFP-infizierten Zellen entspricht (nicht dargestellt).

Da sich die Ergebnisse am Pankreas im wesentlichen zu allen Zeitpunkten ähnelten, sind nur der erste und der vierte Tag p.i. gezeigt. Die Tiere, die nur mit CVB3H3EGFP infiziert wurden, zeigten als einzige eine Fluoreszenz. Diese war konstant zu allen Zeitpunkten nachweisbar, jedoch fanden sich keine quantitativen Unterschiede in Tieren mit höheren Titrationswerten. Die Mäuse, welche zusätzlich mit einem zytokinexprimierenden Virus vorinfiziert wurden, wiesen zu keinem Zeitpunkt fluoreszierende Zellen auf, dabei machte es keinen Unterschied, welches Zytokin exprimiert wurde (siehe Abb. 18).

5.4.2.4. Histologischen Untersuchung

Am ersten Tag p.i. waren in der CVB3GM-CSF-vorinfizierten Gruppe schon Entzündungsinfiltrate zu erkennen, in der Gruppe, die nur CVB3H3EGFP injiziert bekam, war ein unauffälliges Pankreas zu sehen. Am darauffolgenden Tag erschienen auch in den nur CVB3H3EGFP-infizierten Tieren Infiltrate, jedoch waren sie noch geringer ausgeprägt, als in der CVB3GM-CSF-vorinfizierten Gruppe (siehe Abb. 19). Zum nächsten Zeitpunkt waren die Infiltrate in der nur mit CVB3H3EGFP-infizierten Gruppe stärker, auch als die der CVB3GM-CSF-infizierten Mäuse, die hier schon erste Fettgewebsbildung zeigten. Die Schnitte der nur CVB3H3EGFP-infizierten Gruppe waren am 4. Tag p.i. durch massive Entzündungsinfiltrate gekennzeichnet, die von wenigen intakten exokrinen Pankreaszellen durchsetzt waren. Die CVB3GM-CSF-infizierte Gruppe hingegen zeigte ein zurückgehendes Infiltrat und nur relativ geringe Destruktionen, die mit einem symptomlosen Weiterleben der Tiere vereinbar gewesen wären (siehe Abb. 19).

1. Tag p.i.



CVB3H3EGFP

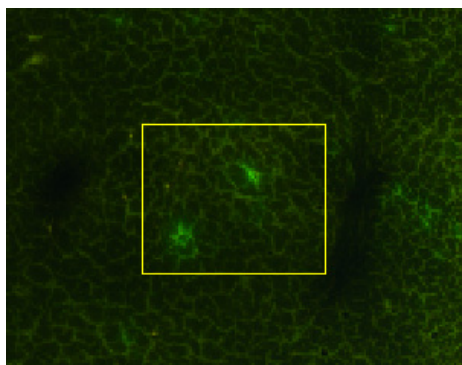
100x



+ CVB3GM-CSF

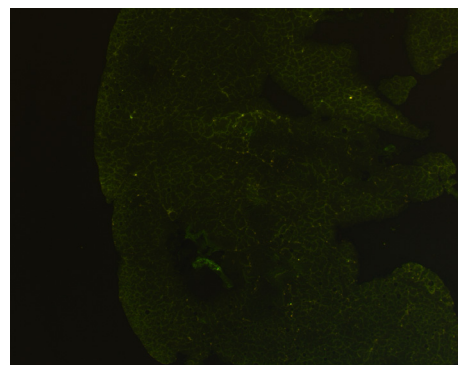
100x

4. Tag p.i.



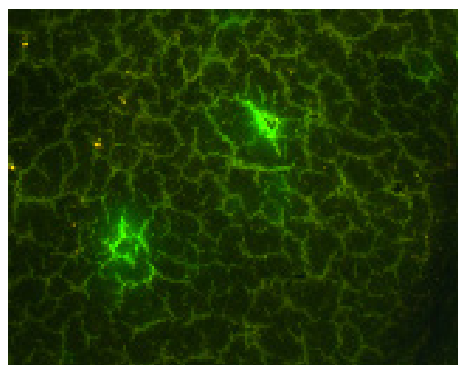
CVB3H3EGFP

100x



+ CVB3GM-CSF

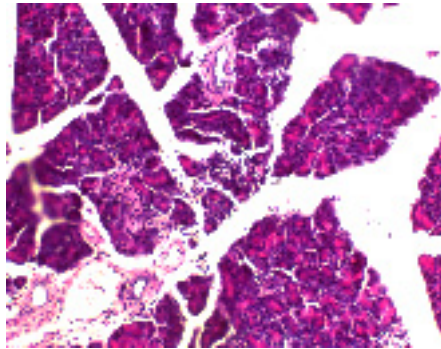
100x



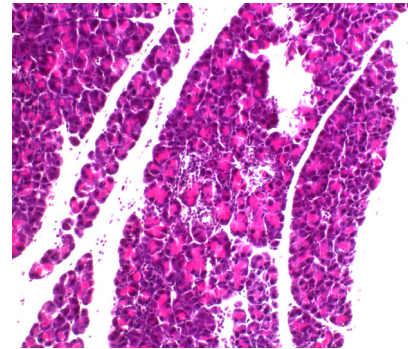
CVB3H3EGFP

200x

Abb. 18: Gefrierschnitte vom 1. und 4. Tag p.i. der nur CVB3H3EGFP-infizierten und der zusätzlich mit CVB3GM-CSF-vorinfizierten Tiere.

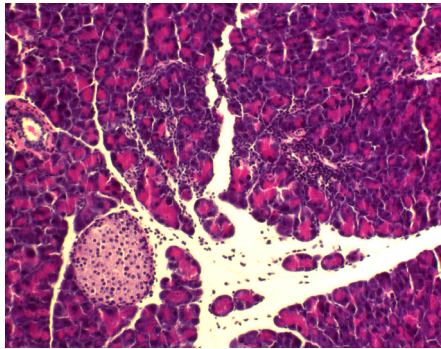


CVB3H3EGFP 200x

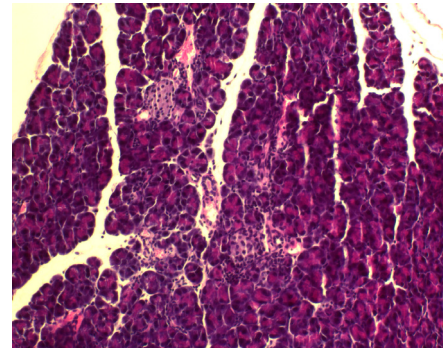


+ CVB3GM-CSF 200x

1. Tag p.i.

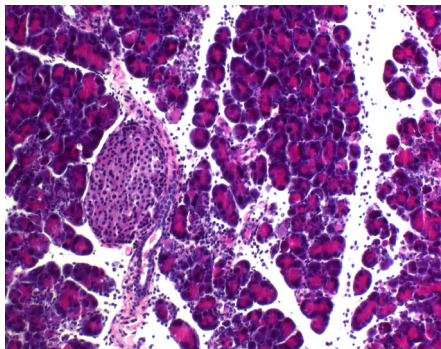


CVB3H3EGFP 200x

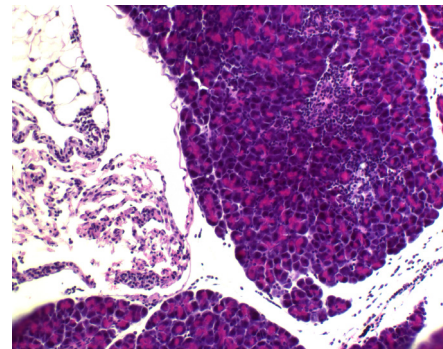


+ CVB3GM-CSF 200x

2. Tag p.i.

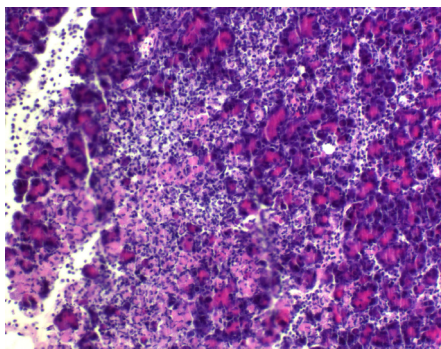


CVB3H3EGFP 200x

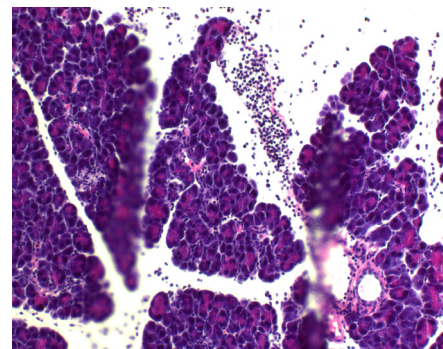


+ CVB3GM-CSF 200x

3. Tag p.i.



CVB3H3EGFP 200x



+ CVB3GM-CSF 200x

4. Tag p.i.

Abb. 19: Histologie vom 1. bis 4. Tag p.i. der nur mit CVB3H3EGFP- und der mit CVB3GM-CSF-vorinfizierten Tiere.

6. Diskussion

Zur Zeit gibt es keine spezifische Prophylaxe oder antivirale Therapie für eine virale Myokarditis, die in bis zu 50 % der Fälle durch Coxsackie- oder andere Enteroviren verursacht wird. Myokarditiden können chronifizieren und in eine DCM übergehen, allein in den USA werden jedes Jahr etwa 100000 neue Fälle davon diagnostiziert. Kardiomyopathien, zu denen auch die DCM zählt, stellen in rund 43,5% die Ursache für eine Herztransplantation bei Erwachsenen dar (O'Connell et al. 1995). Dadurch entsteht nicht nur ein erheblicher wirtschaftlicher und ökonomischer Schaden. Auch der persönliche Leidensweg der Betroffenen ist oft erheblich.

Nicht nur bei der Entwicklung von Impfstoffen wurde den Zytokinen, die als Immunregulatoren und Immunadjuvantien wirken, zunehmende Aufmerksamkeit gewidmet, sondern auch bei vielen anderen Ansatzpunkten, das Immunsystem in eine gewünschte Richtung zu modulieren. GM-CSF hat Effekte auf viele verschiedene Zellen, es führt zur Vermehrung und Differenzierung von Mono- und Myelozyten, erhöht die antimikrobielle Aktivität von Makrophagen und wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten (Nicola et al. 1983, Grabstein et al. 1986). Der funktionelle Status von Langerhanszellen der Haut kann sensibilisiert werden. GM-CSF wirkt nicht direkt hemmend auf die Virusvermehrung in infizierten Zellen, wie z. B. die Interferone, kann aber deren Bildung induzieren. Es hat eine Bedeutung in der TH1-Antwort und kann so protektive Effekte entfalten.

Bei der viralen Myokarditis erfolgt die Infektion der Myozyten auf hämatogenem Weg. Daran schließt sich eine Zell-zu-Zell-Ausbreitung der Viren an, die durch direkte Zytotoxizität zu fokalen Nekrosen führen. Nach drei Tagen entstehen die ersten Infiltrate. Zuerst wandern NK-Zellen und Makrophagen ein, gefolgt von aktivierten T-Zellen (Seko et al. 1997), welche eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Myokarddestruktion spielen und ihr Maximum am 7.-14. Tag p.i. erreichen. Die höchsten Virustiter werden am 4. Tag p.i. gemessen, neutralisierende Antikörper hingegen steigen erst am 8.-10. Tag p.i. stark an. Auf den kardialen Myozyten wird die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen und ICAM-1 stark induziert (Seko et al. 1990, Seko et al. 1993). Eine Myokarditis kann von der akuten Form in einen chronischen Verlauf übergehen.

Dann ist nur noch in einer geringen Zahl von Zellen virale RNA nachweisbar. Letztendlich ist der Übergang in eine DCM möglich.

In Blutproben von Patienten mit akuter Myokarditis konnten erhöhte GM-CSF-Spiegel gefunden werden (Matsumori et al. 1994). Im Mausmodell waren erhöhte mRNA Werte dieses Zytokins ab dem 5. Tag p.i. messbar, was annehmen ließ, dass es von den infiltrierenden Zellen gebildet worden ist. GM-CSF-mRNA war nicht in vitro nachweisbar. Andere TH1-Zytokine, wie IL-2, IFN- γ und TNF- β wurden in vivo stärker als in vitro exprimiert (Seko et al. 1997). Dies indizierte, dass die Zellen, die das Herz infiltrierten und die frühe Phase der Immunantwort beeinflussten, vom TH1-Typ waren. GM-CSF und andere Zytokine könnten in die Induktion und Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und weitere Zellen involviert gewesen sein.

In der vorliegenden Arbeit ist in vitro und in vivo die Wirkung eines rekombinanten Coxsackievirus, das die Sequenz für murines GM-CSF enthält, untersucht worden. Das exprimierte GM-CSF war biologisch aktiv. Der Verlauf der Virustiter und die Produktion von GM-CSF wurde anhand von männlichen, 4-6 Wochen alten Balb/c-Mäusen ermittelt. Die histologische Untersuchung ermöglichte die Beurteilung von Herz und Pankreas hinsichtlich Infiltraten und Organdestruktion. Ebenfalls sind Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Dosen des letalen CVB3H3 gechallenged worden. In vitro wurde eine Koinfektion von GMK-Zellen mit CVB3H3EGFP durchgeführt, dies wurde auch in vivo nachvollzogen. Die Versuche wurden im Kontext zu bereits erfolgten Untersuchungen an rekombinanten CVB3IL-10 und CVB3IFN- γ durchgeführt (Henke et al. 2001, Henke et al. 2003).

6.1. In vitro Charakterisierung des rekombinanten, GM-CSF-exprim. CVB3

Plaques entstanden durch virusinduzierte Zelllyse, die zu einer fehlenden Anfärbbarkeit des Zellrasens an dieser Stelle führten. Im Vergleich der Morphologie zeigte das rekombinante Virus deutlich kleinere Plaques, CVB3WT hingegen ließ eine deutlich stärkere Ausbreitungstendenz erkennen. Durch die Insertion war ein attenuiertes Virus mit limitierter Virusreplikation und einer geringeren Replikationseffizienz entstanden. Für CVB3IL-10 und CVB3IFN- γ wurden vergleichbare Werte ermittelt. Dies schien ein typisches Phänomen von

Viren mit Insertionen zu sein, gleichgültig, ob dadurch ein biologisch aktives Protein entstand oder nicht (Henke et al. 2001). Auch war dies nicht nur an den Coxsackievirusstamm gebunden. Für ein rekombinantes Respiratory Syncytial Virus (RSV) mit der murinen GM-CSF Sequenz wurde ebenfalls ein verzögertes und reduziertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp beschrieben (Bukreyev et al. 2001). Der Verlauf der Wachstumskurve des CVB3GM-CSF war analog zu der des CVB3WT, jedoch mit entsprechend niedrigeren Titern zu den jeweiligen Zeitpunkten. Ähnliche Werte hingegen erbrachten die CVB3IL-10 und CVB3IFN- γ , deren Verlauf mit CVB3GM-CSF vergleichbar war (Henke et al. 2001). Daher bot sich ein Vergleich dieser drei Viren untereinander an.

Anhand des Bioassays konnte die biologische Wirksamkeit des simultan zur Virusreplikation gebildeten GM-CSF nachgewiesen werden. Der gemessene Wert lag an der Grenze des Nachweisbaren, die auch bei anderen Autoren mit etwa 20 pg/ml angegeben wird (Matsumori et al. 1994). Zur Ermittlung noch geringerer Konzentrationen ist diese Methode nicht geeignet.

6.2. Nachweis infektiösen Viruses mittels TCID₅₀-Test und auf RNA-Ebene

Der Nachweis des Virus im Gewebe erlaubte Schlüsse zur Replikationsfähigkeit und Ausbreitung *in vivo*. Dabei wurde mittels TCID₅₀-Test infektiöses Virus detektiert. Die RT-PCR hingegen beurteilte das Vorhandensein von Virusgenom, was nicht mit einer Replikation oder Infektiösität gekoppelt sein musste. Im Pankreas stiegen die Titer des CVB3GM-CSF bis zum 4. Tag p.i. auf Werte um 10^4 logTCID₅₀/50 μ l und fielen danach wieder ab, bis sie am 7. Tag p.i. bei Null lagen. Das CVB3WT erreichte im Pankreas am 1. Tag p.i. maximale Titer von $10^{8,2}$ logTCID₅₀/50 μ l, was etwa das zehntausendfache des Maximums von CVB3GM-CSF *in vivo* war. Danach fielen die Werte, bis am 7. Tag p.i. kein Virus mehr detektierbar war. Im Herz der CVB3WT-infizierten Tiere waren ab dem 1. Tag p.i. Virustiter messbar, die am 7. Tag p.i. ihren Höchstwert erreichten. Anschließend fielen sie ab, betrugen jedoch am 14. Tag p.i. immer noch $10^{2,88}$ logTCID₅₀/50 μ l. Das CVB3GM-CSF hingegen war nur im Pankreas, jedoch nicht im Herz mittels TCID₅₀-Test nachweisbar. Der CVB3WT amplifizierte sich zuerst im Pankreas, um danach das Herz zu infizieren.

In der RT-PCR stellte sich der Verlauf des Virusnachweises im Pankreas analog zu den Titern dar. Kein Virusgenom ließ sich, ebenso wie im TCID₅₀-Test, vom

1.-5. Tag p.i. im Herz nachweisen. In diesem Organ war auch keine Pathologie in der histologischen Untersuchung zu erkennen. Die vergleichbaren rekombinanten CVB3 lieferten entsprechende Ergebnisse, sie infizierten nur das Pankreas und nicht das Herz, wobei die zeitlichen Verläufe und die Höhe der Werte ähnlich waren. Dies stärkte die Annahme, dass der positive Genomnachweis im Herz eine Verunreinigung sein könnte. Die Elimination des Virus innerhalb der ersten sieben Tage p.i. und das Wissen, dass die Zahl neutralisierender Antikörper erst am 8.-10. Tag p.i. stark ansteigt, deutete auf eine hohe Bedeutung der zellulären Immunantwort hin. Die aufgeführten Ergebnisse, dass die rekombinanten Viren in vivo geringere Titer als der Wildtyp erreichten, wurden auch bei anderen Viren gefunden. So zeigte das rekombinante RSVGM-CSF in vivo geringere Titer als der RSVWT (Bukreyev et al. 2001). Das kann für einen Einfluss des simultan zur Replikation synthetisierten GM-CSF sprechen.

6.3. Nachweis von GM-CSF mittels immunhistochemischer Untersuchung und RT-PCR

Mit einem AK, der an das aminoterminal Ende von murinem GM-CSF bindet, konnte es auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zu keinem Zeitpunkt war die immunhistochemische Untersuchung für GM-CSF am Herz erfolgreich. Dies entsprach den vorangegangenen Ergebnissen, da diese Methode ebenfalls nicht so sensitiv wie die RT-PCR war. Im Pankreas war nur für die ersten vier Tage p.i. eine Färbung zu sehen, obwohl für den 5. Tag p.i. noch Virus titrierbar war. Da dies der niedrigste gemessene Wert war, kann vermutet werden, dass hier die Grenze der Nachweisbarkeit mittels immunhistochemischer Untersuchung lag. In der Zuordnung von Tieren mit besonders hoher Viruslast konnte keine positive Korrelation zu den Schnitten entdeckt werden. Dagegen wurde deutlich, dass der entsprechende Anschnitt einen Einfluss hat. Da nur geringe Virustiter erreicht wurden, war es von Bedeutung, mehrere Schnitte anzufertigen, um die Wahrscheinlichkeit einer Färbung zu erhöhen. Der Nachweis der GM-CSF-Sequenz verhielt sich analog zu dem des Virusgenoms, jedoch war er nicht für alle Tiere positiv.

6.4. Bewertung der histologischen Untersuchung

In der histologischen Untersuchung der mit CVB3GM-CSF-infizierten Tiere fanden sich schon ab dem 1. Tag p.i. im Pankreas geringe Entzündungsinfiltrate, die dann verstärkt in Erscheinung traten. Ab dem 4. Tag p.i. erschienen Nekrosen. Das Auftreten von Infiltraten war entsprechend beim CVB3WT. Ab dem 5. Tag p.i. war eine deutlich stärkere Zerstörung des exokrinen Pankreas zu erkennen, was sich im Verlust intakter Zellen widerspiegelte. Diese Destruktion schritt weiter fort. Demgegenüber stand ein gut strukturiertes Pankreas mit zurückgehenden Infiltraten der CVB3GM-CSF-infizierten Tiere am 7. Tag p.i. In den Herzen waren dagegen zu keinen Zeitpunkten Infiltrate oder Nekrosen zu erkennen. Dies ging mit den Ergebnissen der Virustiter und der RT-PCR konform, widersprach sich also nicht, da ohne Virus keine Infiltrate entstehen konnten. In den Herzen der CVB3WT-infizierten Mäuse erschienen ab dem 5. Tag p.i. Infiltrate, die mit Myozytennekrosen und einer Destruktion einhergingen. Die Histologie der CVB3IL-10- und CVB3IFN- γ -infizierten Mäuse ließ ebenfalls keine Infiltrate im Herz und eine deutlich geringere Destruktion des Pankreas erkennen. Sie lieferten ähnliche Bilder wie das CVB3GM-CSF.

Durch welche Effekte konnten diese rekombinanten Viren so schnell und effektiv eliminiert werden? Burkreyev et al. zeigten, dass nach Infektion mit RSVGM-CSF die IFN- γ und IL-12 p40 mRNA-Werte lokal deutlich anstiegen (Burkreyev et al. 2001). IFN- γ , das von NK-Zellen und T-Zellen produziert wird, hemmt die Virusvermehrung in infizierten Zellen, induziert die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen und aktiviert Makrophagen und NK-Zellen. IL-12 steigert die Zytotoxizität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen und führt zu verstärkter IFN- γ Produktion. Zusammen mit der Wirkung des GM-CSF auf Monozyten und Makrophagen könnte dies zu einer starken zellulären Immunantwort und schnelleren Viruselimination beitragen. In dem Modell des RSVGM-CSF war die Zahl mononukleärer Zellen und CD4⁺-T-Lymphozyten signifikant erhöht, die Anzahl zytotoxischer T-Zellen jedoch geringfügig niedriger als im Vergleich zum RSVWT. Die Zahl pulmonaler lymphoider und myeloischer Dendritischer Zellen war um das vierfache erhöht und MHC-Klasse-I Moleküle wurden verstärkt exprimiert. So kam es nicht nur zu einer Anreicherung

antigenpräsentierender Zellen, sondern auch zu einer Verstärkung von deren Aktivität (Bukreyev et al. 2001). Dies könnte als ein direkter Einfluss des GM-CSF auf diese Zellen verstanden werden, da bereits eine Sensibilisierung von Langerhans-Zellen bekannt ist. Auch in rekombinanten Avian Poxviren mit der GM-CSF Sequenz wurde eine Anreicherung antigenpräsentierender Zellen in regionalen Lymphknoten beschrieben (Kass et al. 2001). Auf diesem Weg könnte es zu einer besseren Erkennung von Fremdan antigenen kommen und zu einer Aktivierung entsprechender Zellen führen.

6.5. Koinfektion mit CVB3H3EGFP in vivo und in vitro

In vitro fanden sich bei ansteigenden Konzentrationen von CVB3GM-CSF eine fallende Zahl fluoreszierender Zellen, deren Fluoreszenz die CVB3H3EGFP-Infektion anzeigte. Hier spielte die Konkurrenz der beiden Viren um Bindungsplätze und die Nutzung des Stoffwechsels die entscheidende Rolle, da in vitro keine direkten GM-CSF-Effekte entstehen konnten. Dies bildete die Grundlage für die Resultate des folgenden beschriebenen Versuchs. In vivo kam es bei den nur mit CVB3H3EGFP infizierten Tieren zu höheren Virustitern als bei den zusätzlich mit rekombinanten Viren infizierten Tieren. Dass die Mäuse mit gleichen Mengen an CVB3H3EGFP infiziert wurden und die rekombinanten Viren zusätzlich erhielten, zeigt, dass die geringeren Titer nicht nur auf dem attenuierten Phänotyp beruhten, sondern tatsächlich durch die Zytokine schneller und effektiver mehr Virus eliminiert wurde. Noch ausgeprägter als bei CVB3GM-CSF war dies bei CVB3IFN- γ . IFN- γ hemmt die Vermehrung in infizierten Zellen und konnte so „virusspezifischer“ wirken. So fanden sich in den Gefrierschnitten nur in den nicht koinfizierten Tieren fluoreszierende Areale, die entsprechend den in vitro Versuchen das CVB3H3EGFP indirekt nachwiesen. Hiraoka et al. zeigten im Mausmodell, dass M-CSF, nicht jedoch G-CSF, zu niedrigeren Titern von CVB3 am 7. Tag p.i. führte und IFN- α am 4. Tag p.i. deutlich erhöht war. Dies war am 10. Tag p.i. nicht mehr nachweisbar (Hiraoka et al. 1995). Auch IFN- α hemmt die Replikation in virusinfizierten Zellen und kann so deren Vermehrung behindern (Hisayasu et al. 2001). Die Monozytenzahlen im peripheren Blut waren am 7. und 14. Tag p.i. erhöht. Dies deutete auf eine Aktivierung der Abwehr hin.

Zusammen mit den Wirkungen auf Makrophagen und andere Zellen könnte eine bessere Abwehr entstehen.

6.6. Challenge mit letalem CVB3H3

a) Mäuse, die 3 Wochen nach Injektion von CVB3GM-CSF mit 5 LD₅₀ (letale Dosis₅₀) des letalen CVB3H3 infiziert wurden, überlebten zu 100 %, mit CVB3WT-infizierte Tiere hatten eine Überlebensrate von 48,9 %. Eine LD₅₀ stellt die Menge an Virus dar, bei deren Verabreichung 50 % der Population sterben. Das fünffache dieser Dosis stellt hohe Anforderungen an die Abwehr, um ein Überleben des Organismus möglich zu machen. Trotz dieser hohen Dosis starb keines der Tiere. Die CVBWT-Infektion führte ebenfalls zu einer Aktivierung des Immunsystems, was zur Folge hatte, dass nicht alle Tiere verstarben. Anscheinend hatte das Überstehen einer nicht letalen Infektion und eine ausreichende Rekonvaleszenzzeit eine nicht unerhebliche Aktivierung der Abwehr zur Folge. Dies konnte durch GM-CSF noch optimiert werden, so dass maximale Überlebensraten erreicht wurden. In der histologischen Untersuchung waren im Pankreas geringe Infiltrate und kleine Nekroseareale 4 Wochen nach dem Challenge zu finden, im Gesamtbild erschien das Gewebe nur wenig angegriffen. Diesen langandauernden Schutz vor einer letalen Infektion fand sich auch bei CVB3IL-10 und CVB3IFN- γ , die unter den gleichen Versuchsbedingungen Überlebensraten von 100 % erreichten. Auf welchem Weg dieser langanhaltende Effekt auf das Immunsystem erreicht wurde, kann momentan noch nicht gesagt werden. Bukreyev et al. fanden, dass nach 29 Tagen keine erhöhten Spiegel der IFN- γ und IL-12 p40 mRNA mehr nachzuweisen waren, es also nicht auf dieser Wirkung beruhte (Bukreyev et al. 2001). Es ist bekannt, dass Zytokine eine schützende oder verstärkende Rolle in der Myokarditis übernehmen können, auf welchem Weg ist allerdings noch nicht vollständig geklärt.

In einem Mausmodell für Brustkrebs wurden Mäusen Krebszellen injiziert, anschließend infizierte man sie mit einem rekombinanten Vakzinia Virus (VV), während dessen Replikation biologisch aktives GM-CSF produziert wurde. Dies führte zu einem kompletten Schutz der Tiere vor einem Challenge mit parenteralen Tumorzellen. Tiere, die nicht VVGM-CSF-infiziert

wurden, waren nicht geschützt. Es wurde eine Vermehrung von Vorläuferzellen der zytotoxischen T-Zellen beobachtet. Diese war besonders hoch in der Kombination mit VVIL-7 (Lees et al. 2000). IL-7 ist ein Zytokin, das zu einer Proliferation und Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen führt. GM-CSF hat demnach einen allgemeinen Schutz vor Antigenen zur Folge, egal ob viraler oder tumoröser Natur. In Sedegah et al. führte die Infektion von GM-CSF- und antigentragenden Plasmiden und darauffolgendes Boostern zu einer sehr guten Immunität gegen Pockenviren, wobei GM-CSF einen Influx von antigenpräsentierenden Zellen in die Injektionsstelle induzierte (Sedegah et al. 2000).

- b) Die Tiere, die einen Tag nach Inokulation von CVB3GM-CSF mit 100 LD₅₀ CVB3H3 infiziert wurden, überlebten innerhalb 4 Wochen zu 66,7 %, CVB3IFN- γ führte zu einer Überlebensrate von 87,5 %, CVB3IL-10 zu 62,5 % (Henke et al. 2003). In der Histologie war eine starke Zerstörung des exokrinen Pankreas sichtbar. Es bestanden nur noch vereinzelte intakte Zellinseln inmitten von Fettgewebe. Wurden die Tiere mit CVB3WT statt CVB3GM-CSF infiziert, so überlebten 12,5 %. Keines überlebte, wenn sie vorher kein Virus inokuliert bekamen. Hier spielte die Konkurrenz der beiden Viren um Bindungsplätze und die Nutzung des Wirtsstoffwechsels eine bedeutende Rolle. So konnte die Verdrängung des letalen Virus durch eine attenuiertes den Verlauf der Erkrankung mildern. Die Wirkung des GM-CSF hat hier sicherlich in einer Aktivierung des Immunsystems und damit einer verbesserten Viruselimination bestanden.

GM-CSF steigert die Anzahl antigenpräsentierender Zellen und bewirkt deren Aktivierung, was in verschiedenen Studien gezeigt wurde (Ahlers et al. 2001, Bukreyev et al. 2001, Kass et al. 2001). Während einer Myokarditis kommt es zu einer verstärkten Expression von MHC-Klasse-I Molekülen. Dadurch werden auch Virusantigene durch infizierte Zellen stärker präsentiert, so dass infizierte Zellen besser identifiziert werden können und deren Elimination eingeleitet werden kann. Ahlers et al. untersuchten den Einfluss von Zytokinen auf die Immunantwort gegen ein HIV-Protein (Ahlers et al. 2001) Hierbei kristallisierte sich eine bedeutende Rolle der CD4⁺-Helferzellinduktion und der IFN- γ -

Produktion heraus, um vor einer weiteren viralen Infektion zu schützen. Ein kompletter Schutz wurde nur für die Kombination von GM-CSF, IL-12 und TNF- α erreicht, das Fehlen von CD4⁺-T-Zellen und eine IFN- γ -Resistenz bedeutet einen Verlust dieses Schutzes. Diese drei Zytokine spielten eine Rolle in der TH1-Antwort, was auf deren essentielle Bedeutung beim Schutz vor viralen Infektionen hinweist. Komplettiert wurde die Immunantwort noch durch Antikörperbildung.

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist mit lymphoproliferativen Erkrankungen assoziiert. In SCID-Mäusen konnte eine Erkrankung durch eine Niedrigdosisgabe von IL-2 verhindert werden. Dieser Effekt ging allerdings verloren, wenn die NK-Zellen fehlten. Durch die Gabe von GM-CSF und niedrigdosiertem IL-2 wurde trotzdem ein Schutz erreicht, wobei eine Erhöhung der CD3⁺CD8⁺-Lymphozyten in vivo beobachtet wurde (Baiocchi et al. 2001).

Aktivierte Makrophagen und Monozyten produzieren Zytokine wie IL-12, IL-15 und IL-18, die wiederum in der Lage sind, andere Zellen, wie NK-Zellen, in ihrer Funktion zu aktivieren. Das verstärkt deren Zytotoxizität und fördert z. B. die IFN- γ -Produktion. In vielen verschiedenen Modellen führte GM-CSF allein oder zusammen mit anderen Zytokinen zu einem Schutz vor Tumorzellen oder konnte zur Beseitigung von chronischen Virusinfektionen beitragen. Dies schien besonders durch die Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen bedingt zu sein. Bei der Gabe von GM-CSF in der Entwicklung von HIV-Impfstoffen führte es zu einer Erhöhung der zytotoxischen T-Lymphozyten, des IL-2, IL-4 und der neutralisierenden Antikörper, nicht jedoch zu einer IFN- γ -Erhöhung (Ahlers et al. 2003). Hiraoka et al. hingegen zeigten, dass M-CSF zu einem Anstieg von IFN- α führte (Hiraoka et al. 1995).

Aus den dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass in verschiedenen Modellen für unterschiedliche Viren protektive Effekte von GM-CSF entweder in der Insertion der Sequenz in Viren oder in der direkten Gabe rekombinanten GM-CSF's erzielt werden konnten. Dies scheint auf verschiedenen Wirkungen des Zytokins zu beruhen. Dabei ist einmal die Verstärkung der Antigenpräsentation zu nennen, aber auch die Aktivierung bestimmter Zellen, die wiederum zu erhöhten Spiegeln von Zytokinen wie IL-12 und IFN- γ führt, die direkt die Virusvermehrung in infizierten Zellen einschränken können.

7. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch die simultane Expression eines TH1-Zytokins ein langanhaltender Schutz vor einer letalen Infektion erreicht werden kann. Es ist noch unklar, auf welchem Weg dies erreicht wird, da 3 Wochen nach der Erstinfektion bisher keine Veränderungen im Zytokinmuster entdeckt werden konnten. Ein positiver Einfluss von Zytokinen bei der Modulation von Immunantworten in eine gewünschte Richtung kann als gesichert gelten. Auch bei einer Koinfektion mit anderen Viren entfalten sich protektive Effekte, die zur Behandlung bei einer bereits akquirierten Infektion genutzt werden können.

Den Zytokinen wird in der Entwicklung von Impfstoffen eine steigende Bedeutung zugewiesen, besonders um den Effekt der Erinnerungsreaktion zu verstärken und so einen sichereren und effektiveren (stärkeren) Schutz zu erreichen. Dabei kristallisiert sich zunehmend heraus, dass nicht einzelne Zytokine den besten Effekt erzielen, sondern Kombinationen die besten Ergebnisse hervorbringen. Die ausgewählten Zytokine müssen verstärkende Effekten auf das Immunsystem haben und verschiedene oder einen bestimmten Ansatzpunkte der Abwehr stimulieren. Jedoch muss vorher die natürliche Wirkung und das Vorhandensein eines gewünschten Effektes in vivo untersucht sein. So scheint die Verwendung von Zytokinen als zusätzliche oder einzige Immunadjuvantien möglich zu werden. Dabei könnte auch GM-CSF eine Rolle spielen, besonders durch seine in Experimenten nachgewiesene Eigenschaft, die Antigenpräsentation durch entsprechende Zellen zu verstärken und somit eine stärkere und effektivere Immunantwort zu bewirken. Unklar sind momentan noch die Mechanismen, die zu einem langanhaltenden Schutz vor letalen Infektionen führen. In der viralen Myokarditis wird weiterhin die Verwendung von Zytokinen untersucht, die sowohl zu einer Entwicklung eines Impfstoffs für bereits infizierte Personen führen könnte oder zu der erfolgreichen Applikation rekombinanter Zytokine, wie es bereits für die Hepatitis praktiziert wird. So ist zu hoffen, dass sich auf diesem Gebiet in den nächsten Jahren klinisch anwendbare Möglichkeiten ergeben. Auf diese Weise werden auch die Wirkungsweisen und Angriffspunkte von Zytokinen noch besser untersucht, was

dazu beitragen kann, die komplexen und in vielen Punkten noch unklaren Mechanismen der Immunantwort besser zu verstehen und zu nutzen.

8. Literatur

Ahlers JD, Belyakov IM, Matsui S, Berzofsky JA. 2001. Mechanisms of cytokine synergy essential for vaccine protection against viral challenge. *Int Immunol*, 13(7):897-908

Ahlers JD, Belyakov IM, Berzofsky JA. 2003. Cytokine, Chemokine and Costimulatory Molecule Modulation to Enhance Efficacy of HIV Vaccines. *Curr Mol Med*, 3:285-301

Baiocchi RA, Ward JS, Carrodegua L, Eisenbeis CF, Peng R, Roychowdhury S, Vourganti S, Sekula T, O'Brien M, Moeschberger M, Caligiuri MA. 2001. GM-CSF and IL-2 induce specific immunity and provide protection against Epstein-Barr virus lymphoproliferative disorder. *J Clin Invest*, 108:887-894

Bowles NE, Olsen EG J, Richardson PJ, Archard LC. 1986. Detection of CVB-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 17:1120-1123

Braun RW, Doerr HW, Feldmann H, Forster J, Hauberg Hechler R, Holzmann H, Jilg W, Liebert HG, Popow-Kraupp T, Pustowoit B, Roggendorf M, Roß RS, Schmitz H, Schneider-Schaulies S, Scholz H, Schreier E, Stein F, Stelzner A, Streichert H-J, ter Meulen V. 2004. Virale Erkrankungen durch RNA-Viren. In: Adam D, Doerr HW, Link H, Lode H, Hrsg. *Die Infektiologie*. Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer Verlag, 819-885

Bukreyev A, Belyakov IM, Berzofsky JA, Murphy B, Collins PL. 2001. Granulocyte-Makrophage Colony-Stimulating Factor Expressed by Recombinant Respiratory Syncytial Virus Attenuates Viral Replication and Increases the Level of Pulmonary Antigen-Presenting Cells. *J Virol*, 75(24):12128-12140

Burgess AW, Metcalf D. 1980. The Nature of Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factors. *Blood*, 56(6):947-958

Burney IA, Salam A, Jat AA, Iqbal MP, Siddiqui T, Khan MA, Smego RA. 2003. Comparison of low-dose versus standard-dose colony-stimulating factor in patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Oncology*, 65(3):283-284

Böcker W, Denk H, Heitz PU. 2001. *Pathologie*. München, Jena: Urban und Fischer Verlag

Cafori AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. 2002. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail*, 4(4):411-417

Camerini F., Di Lenarda A., Lardieri G., Mestroni L., Perkan A., Pinamonti B., Salvi A., Sinagra A. 1993. Natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy. In: Figulla HR, Kandolf R, McManus B, Eds. *Idiopathic dilated cardiomyopathy*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 26-42

Cantrell MA, Anderson D, Cerretti DP, Price V, McKereghan K, Tushinski RJ, Mochizuki DY, Larsen A, Grabstein K, Gillis S. 1985. Cloning, sequence and expression of human CSF2 and IL3 genes. *Proc Natl Acad Sci*, 82(18):6250-6254

Chapman NM, Ragland A, Leser JS, Hofling K, Willian S, Semler BL, Tracy S. 2000. Coxsachievirus Expression of the Murine Interleukin-4 Induces Increased Synthesis of Immunglobulin G1 in Mice. *J Virol*, 74(17):7952-7962

Chiba S, Tojo A, Kitamura T, Urabe A, Miyazono K, Takaku F. 1990. Characterization and molecular features of the cell surface for human GM-CSF. *Leukemia*, 4(1):29-36

Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ. 1991. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*, 80:564-572

Costanzo MR, Augustine S, Bourge R, Bristol M, O'Connell JB, Driscoll D, Rose E. 1995. Selection and treatment of candidates for heart transplantation. A statement for health professionals from the Committee on heart failure and cardiac transplantation of the council on clinical cardiology, American Heart Association. *Circulation*, 92:3593-3612

Costanzo MR. 1996. Selection and treatment of candidates for heart transplantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 8:113-125

Dalldorf G, Sickles GM. 1948. An unidentified, filterable agent isolated from feces of children with paralysis. *Science* 108:61-62

Dexter TM, Garland J, Scott D, Scolnich E, Metcalf D. 1980. Growth of factor dependent hemopoietic precursor cell lines. *J Exp Med*, 152(4):1036-1047

Fazio S, Sabatini D, Capaldo B, Vigorito C, Giordano A, Guida R, Pardo F, Biondi B, Sacca L. 1996. A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 334:809-814

Fields BN, Knipe DM, Howley PM. 1996. *Fundamental Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven

Figulla HR, Kellermann AB, Stille Siegener M, Heim A, Kreuzer H. 1992. Significance of coronary angiography, left heart catheterization and endomyocardial biopsy for the diagnosis of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am Heart J*, 124:1251-1257

Figulla HR, Stille Siegener M, Mall G, Heim A, Kreuzer H. 1995. Myocardial enterovirus infection with left ventricular dysfunction: a benign disease compared with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 25:1170-1175

Franz WM, Cremer M, Herrmann R, Grunig E, Fogel W, Scheffold T, Goebel HH, Kircheisen R, Kubler W, Voit T, Katus HA. 1995. X-linked dilated cardiomyopathy. Novel mutation of the dystrophin gene. *Ann N Y Acad Sci*, 752:470-491

Frazier OH, Rose EA, Mc Carthy P, Burton NA, Tector A, Levin H, Kayne HL, Poirier VL, Dasse KA. 1995. Improved mortality and rehabilitation of transplant candidates treated with a long-term implantable left ventricular assistant system. *Ann Surg*, 222:327-336

Friman G, Wesslen L, Fohlman J, Karjalainen J, Rolf C. 1995. The epidemiology of infectious myocarditis, lymphocytic myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 16 Suppl O:36-41

Gillum RF. 1986. Idiopathic cardiomyopathy in the United States, 1970-1982. *Am Heart J*, 11:752-755

Glück B, Schmidtke M, Merkle I, Stelzner A, Gerns D. 2001. Persistent expression of cytokines in the chronic stage of CVB3-induced myocarditis in NMRI mice. *J Mol Cell Cardiol*, 33(9):1615-1626

Grabstein KH, Urdal DL, Tushinski RJ, Mochizuki DY, Price VL, Cantrell MA, Gillies S, Conlon PJ. 1986. Induction of Macrophage Tumoricidal Activity by Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor. *Science*, 232(4749):506-508

Gravanis MB, Sternby NH. 1991. Incidence of Myocarditis: A 10-Year Autopsy Study From Malmö, Sweden. *Arch Pathol Lab Med*, 115:390-392

Hare JM, Walford GD, Hruban RH, Hutchins GM, Deckers JW, Baughman KL. 1992. Ischemic cardiomyopathy: endomyocardial biopsy and ventriculographic evaluation of patients with congestive heart failure, dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 20:1318-1325

Hayashida K, Kitamura T, Gorman DM, Arai K, Yokota T, Miyajima A. 1990. Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human GM-CSF: reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 87(24): 9655-9659

Heim A, Stille Siegener M, Kandolf R, Kreuzer H, Figulla HR. 1994. Enterovirus-induced myocarditis: hemodynamic deterioration with immunosuppressive therapy and successful application of IFN- α . *Clin Cardiol*, 17:563-565

Heim A, Grumbach I, Pring-Akerblom P, Stille Siegener M, Muller G, Kandolf R, Figulla HR. 1997. Inhibition of coxsackievirus B3 carrier state infection of cultured human fibroblasts by ribavirin and natural interferon-alpha. *Antiviral Res*, 34(3):101-111

Henke A, Zell R, Ehrlich G, Stelzner A. 2001. Expression of Immunoregulatory Cytokines by Recombinant Coxsackievirus B3 Variants Confers Protection against Virus-Caused Myocarditis. *J Virol*, 75(17):8187-8194

Henke A, Zell R, Martin U, Stelzner A. 2003. Direct interferon- γ -mediated protection caused by a recombinant coxsackievirus B3. *Virology*, 315:335-344

Hiraoka Y, Kishimoto C, Takada H, Suzaki N, Shiraki K. 1995. Colony-stimulating factors and coxsackievirus B3 myocarditis in mice: Macrophage colony-simulating factor suppresses acute myocarditis with increasing interferon- α . *Am Heart J*, 130:1259-1264

Huebner K, Isobe M, Croce CM, Golde DW, Kaufman SE, Gasson JC. 1985. The Human Gene Encoding GM-CSF Is at 5q21-q32, the Chromosome Region Deleted in the 5q⁻ Anomaly. *Science*, 230:1282-1285

Ibelgaufits H. 1995. Dictionary of Cytokines. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VHC

Janeway CA. 2002. Immunologie. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum akademischer Verlag Gustav Fischer

Kandolf R, Klingel K, Zell R, Selinka HC, Raab U, Schneider Brachert W, Bültmann B. 1993. Molecular pathogenesis of enterovirus-induced myocarditis: virus persistence and chronic inflammation. Intervirology, 35:140-151

Kandolf R, 1998. Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy. Med Klin, 93:215-222

Kass E, Panicali DL, Mazzara G, Schlom J, Greiner JW. 2001. Granulocyte/Makrophage-Colony Stimulating Factor Produced by Recombinant Avian Poxvirus Enriches the Regional Lymph Nodes with Antigene-presenting Cells and Acts as an Immunoadjuvant. Cancer Research, 61:206-214

Kawai C. 1999. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death. Circulation, 99:1091-1100

Kirchner H, Kruse A, Neustock P, Rink L. 1993. Cytokine und Interferone: Botenstoffe des Immunsystems. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum akademischer Verlag Gustav Fischer

Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. 1992. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage and inflammation. Proc Natl Acad Sci, 89:314-318

Klingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus BM, Bültmann B, Kandolf R. 1996. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. J Virol, 70:8888-8895

Kuhl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Loher C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. 2003. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular dysfunction. *Circulation*, 107(22):2793-2798

Kuhn H, Gietzen F, Beer G, Pethig K. 1993. Epidemiology of the idiopathic dilated cardiomyopathy. In: Figulla HR, Kandolf R, McManus, Eds. *Idiopathic dilated cardiomyopathy*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 13-25

Lawson CM, Beilharz MW. 1999. Low-dose oral use of interferon inhibits virally induced myocarditis. *Interferon Cytokine Res*, 19(8):863-867

LeBeau MM, Westbrook CA, Diaz MO, Larson RA, Rowley JD, Gasson JC, Golde DW, Sherr CJ. 1986. Evidence for the Involvement of GM-CSF and FMS in the Deletion (5q) in Myeloid Disorders. *Science*, 231:984-987

Lees CJ, Apostolopoulos V, Acres B, Ong CS, Popovski V, McKenzie IFC. 2000. The effect of T1 and T2 cytokines on the cytotoxic T cell response to mannan-MUC1. *Cancer Immunol Immunother*, 48:644-652

Leipner C, Borchers M, Merkle I, Stelzner A. 1999. Coxsackievirus B3-induced myocarditis in MHC classII-deficient mice. *J Hum Virol*, 2(2):102-114

Leipner C, Grün K, Schneider I, Borchers M, Stelzner A. 2000. The outcome of coxsackievirus B3 (CVB3)- induced myocarditis is influenced by the cellular immune status. *Herz*, 25(3):245-248

Liang DC. 2003. The role of colony-stimulating factors and granulocyte transfusion in treatment options for neutropenia in children with cancer. *Paediatr Drugs*, 5(10):673-684

Maisch B. 1998. Einteilung der Kardiomyopathien nach der WHO/ISFC-Task-Force – Mehr Fragen als Antworten?. *Med Klin*, 93(4):199-209

Manoli TA, Baughman KL, Rodeheffer R, Pearson TA, Bristol JD, Michels VV, Abelman WH, Harlan WR. 1992. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 69:1458-1466

Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. 1994. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J*, 72:561-566

Mayo MA. 2002. Virus taxonomy – Houston 2002. *Arch Virol*, 147:1071-107

McKnee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. 1971. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med*, 285(26):1441-1446

Merkle I, Tonew M, Glück B, Schmidtke M, Egerer R, Stelzner A. 1999. Coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis in outbred NMRI mice. *J Hum Virol*, 2(6):369-379

Metcalf D. 1985. The Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors. *Science*, 229:16-22

Metcalf D. 1986. The Molecular Biology and Functions of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors. *Blood*, 67(2):257-267

Miyatake S, Otsuka T, Yokota T, Lee F, Arai K. 1985. Structure of the chromosomal gene for granulocyte-makrophage colony-stimulating factor: comparison of the mouse and human genes. *EMBO J*, 4(10):2561-2568

Modrow S, Falke D, Truyen U. 2003. *Molekulare Virologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum akademischer Verlag Gustav Fischer

Nakata M, Kawasaki A, Azuma M, Tsuji K, Matsuda H, Shinkai Y, Yagita H, Okumura K. 1992. Expression of perforin and cytolytic potential of human peripheral blood lymphocyte subpopulations. *Int Immunol*, 4:1049-1054

Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. 1983. Purification of a Factor Inducing Differentiation in Murine Myelomonocytic Leucemia Cells Identification as Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *J Biol Chem*, 258(14): 9017-9023

Nowousian MR, Waschke S, Bojko P, Welt A, Schuett P, Ebeling P, Flasshove M, Moritz T, Schuette J, Seeber S. 2003. Impact of chemotherapy regimen and hematopoietic growth factor on mobilization and collection of peripheral blood stem cells in cancer patients. *Ann Oncol*, 14Suppl1:i29-i36

Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. 2002. Molecular phylogeny and proposed classification of the simian picornavirus. *J Virol*, 76:1244-1251

O'Connell JB, Breen TJ, Hosenpud JD. 1995. Heart transplantation in dilated heart muscle diseases and myocarditis. *Eur Heart J*, 16 Suppl O:137-139

Osterziel KJ, Markus U, Willenbrock R, Strohm O, Dietz R. 1997. Therapy of dilated cardiomyopathy with recombinant human growth hormone. *Z Kardiol*, 86:803-811

Park LS, Martin U, Sorensen R, Luhr S, Morrissey PJ, Cosman D, Larsen A. 1992. Cloning of the low-affinity murine GM-CSF receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex. *Proc Natl Acad Sci*, 89(10):4295-2599

Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. 1997. *Clinical Virology*. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, Tokyo, San Francisco: Churchill Livingstone Inc.

Schmidtke M, Glück B, Merkle I, Hofmann P, Stelzner A, Gemsa D. 2000. Cytokine profiles in heart, spleen and thymus: During the acute stage of experimental Coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *J Med Virol*, 61:518-526

Schultheiß HP, Pauschinger M, Kühl U. 1998. Pathogenese der entzündlichen Kardiomyopathie. *Med Klin*, 93:229-235

Sedegah M, Weiss W, Sacci JB, Charoenvit Y, Hedstrom R, Gowda K, Majam VF, Tine J, Kumar S, Hobart P, Hoffman SL. 2000. Improving Protective Immunity Induced by DNA-Based Immunization with Antigene and GM-CSF-Encoding Plasmid DNA and Boosting with Antigene-Expressing Recombinant Poxvirus. *J Immunol*, 164(11):5905-5912

See DM, Tilles JG. 1995. Pathogenesis of virus-induced diabetes in mice. *J Infect Dis*, 171(5):1131-1138

Seko Y, Tsuchimochi H, Nakamura T, Okumura K, Naito S, Imataka K, Fujii J, Takaku F, Yazaki Y. 1990. Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackie B3. *Circ Res*, 69:360-367

Seko Y, Matsuda H, Kato K, Hashimoto Y, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. 1993. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by Coxssackievirus B3. *Clin Invest*, 91:1327-1336

Seko Y, Takahashi N, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. 1997. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3. *J Pathol*, 183:105-108

Siena S, Bregni M, Gianni AM. 1999. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for autografting: chemotherapy and G-CSF or GM-CSF. *Barllieres Best Pract Res Clin Haematol*, 12(1-2):27-39

Sole MJ, Liu P. 1993. Viral myocarditis: a paradigm for understanding the pathogenesis and treatment of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 22:99A-105A

Stille Siegener M., Heim A., Figulla H. R. 1995. Subclassification of dilated cardiomyopathy and IFN treatment. *Eur Heart J* 16 Suppl O:147-149

Sugrue DD, Rodeheffer RJ, Codd MB, Ballard DJ, Fuster V, Gersh BJ. 1992. The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. A population-based study. *Ann Intern Med*, 117:117-123

van Leeuwen BH, Martinson ME, Webb GC, Young IG. 1989. Molecular organization of the cytokine gene cluster involving the human IL-3, IL-4, IL-5 and GM-CSF genes on human chromosome 5. *Blood*, 73(5):1142-1148

Wada H, Saito K, Kanda T, Kobayashi I, Fujii H, Fujigaki S, Maekawa N, Takatsu H, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. 2001. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Plays a Protective Role in Acute Viral Myocarditis in Mice. *Circulation*, 103:743-749

Warringa RA, Koenderman L, Kok PT, Kreukniet J, Bruijnzeel PL. 1991. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-makrophage colony-stimulating factor and IL-3. *Blood*, 77(12):2694-2700

Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC. 1994. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 89:2582-2589

Wong GG, Witek JS, Temple PA, Wilkens KM, Leary AC, Luxenberg DP, Jones SS, Brown EL, Kay RM, Orr EC. 1985. Human GM-CSF. Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science*, 228(4701):810-815

Yang YC. 1988. The human genes for GM-CSF and IL3 are closely linked in tandem on chromosome 5. *Blood*, 71:958-61

Lebenslauf

Name: Handke
Vorname: Kathleen
Geb. am: 6. Juni 1979
Geb in: Altenburg

Schulischer Werdegang:

1986-1991	POS Rosa Luxemburg
1991-1998	Veit-Ludwig-von-Seckendorf-Gymnasium
1998	Abitur

Studium

1998 -2005	Studium der Humanmedizin an der FSU Jena mit Ablegen der ärztlichen Prüfung
------------	--

Jena, den 06.12.2005

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Andreas Henke,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich besonders PD Dr. Andreas Henke für die geduldige Betreuung und die intensive Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken. Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie und antivirale Chemotherapie für den regen Gedankenaustausch und die guten Tips. Besonders Beate Menzel möchte ich für die Hilfe beim Erlernen der praktischen Tätigkeiten meinen Dank aussprechen. Auch die Hilfe von Birgit Meißner, Birgit Schikowski und Heike Urban soll nicht unerwähnt bleiben.

Meinem Freund, der mich während der ganzen Zeit mental und mit vielen hilfreichen Tips beim Kampf mit dem Computer unterstützt hat, möchte ich noch einmal besonders danken.